

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**Inhibidores de las vías intracelulares NF- $\kappa$ B y JAK/STAT en el  
tratamiento experimental de la aterosclerosis y la  
nefropatía diabética**

**TESIS DOCTORAL**  
**AINHOA OGUIZA BILBAO**  
**MADRID, 2015**



**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Inhibidores de las vías intracelulares NF- $\kappa$ B y JAK/STAT en el  
tratamiento experimental de la aterosclerosis y la  
nefropatía diabética**

**TESIS DOCTORAL**

**AINHOA OGUIZA BILBAO  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**DIRECTORES: CARMEN GÓMEZ GUERRERO  
Y JESÚS EGIDO DE LOS RÍOS**

**LABORATORIO DE NEFROLOGÍA EXPERIMENTAL Y PATOLOGÍA  
VASCULAR. IIS-FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**





La ignorancia afirma o niega  
rotundamente; la ciencia duda.

**Voltaire**

La ciencia es el alma de la  
prosperidad de las naciones  
y la fuente de vida  
de todo progreso.

**Louis Pasteur**



A mis padres

A Luis





## AGRADECIMIENTOS

Recuerdo la primera vez que estuve en el laboratorio. Estaba en quinto de carrera y había quedado con la Dra. Gómez Guerrero para una entrevista. Me habló de rutas, péptidos y de muchas cosas más que no entendí pero me parecieron interesantes. Ya han pasado casi cinco años, la Dra. Gómez Guerrero se ha convertido en Carmen, ese tema tan lejano para mí es ahora mi tesis y ese laboratorio caótico lleno de gente es *mi labo*.

Quiero empezar agradeciendo a la Fundación Conchita Rábago y a la Fundación Íñigo Álvarez de Toledo por financiarme estos años.

También quiero agradecer al Dr. Jesús Egido por su entusiasmo cuando habla de ciencia y porque cuando inesperadamente me quedé sin financiación se implicó y me ayudó.

Agradezco también a Carmen. Por darme esta oportunidad y por tu trabajo diario. Por cuidar a tu grupo como a una familia y lo más importante de todo, por ser buena persona.

A Beñat por enseñarnos todo lo que sabías cuando entramos en el grupo como nadie nos hubiera enseñado. Hiciste que esa época fuera una de las mejores, por tu paciencia, tu positividad y por tu alegría.

A Carlota por hacer que cuando hablo de todo lo que me ha pasado en este laboratorio hable en plural. No me puedo imaginar mejor compañera y amiga que tú. Pinchar a los ratones con "una vaina loca", los innumerables ataques de risa (momentazos que dan desde una taza de café hasta Camarón) y tener un idioma propio une mucho!

A Iolanda por tener siempre tiempo para ayudar a resolver dudas científicas, por ser organizada, responsable, trabajadora y, sobretodo, por ser mi jefa estos dos últimos meses. Espero que tu siguiente etapa esté llena de éxitos.

A Elena por tener siempre una sonrisa y por esas charlas sobre futuro, expectativas, amor, política... que han hecho que aprenda mucho de ti. Seguro que te espera un futuro brillante del que espero estar informada! A Juan, porque el norte y el sur siempre se han entendido muy bien. Por los buenos ratos que pasamos en la hora de la comida y por los momentos de confianzas. Seguro que vas a llegar lejos porque te lo mereces. A Julio, por cómo eres, por lo que te eché de menos cuando te fuiste y por acogerme en el Bronx unos días. A los dos os digo que lo que une la SEA...jeje.

A Cristina por esas carcajadas cargadas de decibelios, por tu naturalidad, tu sinceridad y por todo lo que te hace única. A Valva, por ser tan maja, por nuestras conversaciones dificultadas por los papeles que nos separan y por tu manera de ver la vida. Espero seguir compartiendo muchas tardes de charla y risas con las dos. A Loli, doctora en biología, porque siempre tienes anécdotas e historias que nos divierten. Por cierto, a ver cuándo nos llevas a tu pueblo!

A los otros jefes, Luis y José Luis. Por ser tan cercanos, por las comidas en Las Barricas y las conversaciones, no igual de profundas siempre, jeje. A Alfonso y a Ernesto, otra de las parejas de labo. Me encanta vuestro pack y ya sabéis, en un par de pitis estáis vosotros leyendo la tesis!

A Jonay porque siempre encontramos un momento para contarnos nuestras historias. Pronto estarás leyendo la tesis y seguro que la siguiente etapa te irá también genial. A Susana y a Patri, porque siempre sabéis cómo ayudarnos y porque sois necesarias para alegrar un poco el laboratorio. A Ana, por el buen rollo que trasmites y por tu risa contagiosa. A Morgui, por esos ratillos que nos amenizas contando chistes y porque siempre estás dispuesto a ayudar. A Sandra, porque hemos vivido la etapa *pretésica* casi a la vez. Espero que todo os vaya fenomenal. A Lucie por hacer nuestro laboratorio un poco más internacional. A Lara, la jovencita del labo, seguro que todo te va muy bien. A Tarín por tus momentos maléficos, aunque creo que deberías pensar otra manera de llamarme...jeje.

Belén, por tener siempre una sonrisa con la que alegrarnos y esas horas de bus de vuelta del máster. ¡Carlos, porque aunque ahora se cierra una etapa seguro que el futuro nos depara cosas mejores! A Cristian, sabes que mi portátil es tuyo también, y por transmitir alegría y buen rollo. A Conchi, otra más que nos ha abandonado...pero que no olvidamos. Juanma poderoso! No imagino mejor tuno que tú! A Diego, por ser un buen fichaje para el labo, tenías que haber entrado antes.

A Marta, por estar siempre dispuesta a ayudar. A Maca, Olga, Raúl, Diego y al resto de los compañeros del laboratorio que sin ellos estos años no hubieran sido iguales.

Tampoco me puedo olvidar de Carlos, Pilar y Juani, los dueños del animalario. Por cuidar de nuestros ratoncitos y por darnos un poco de alegría en épocas de modelos. A Carmen, porque broncas aparte no hay mejor limpiadora que tú. Y cómo no, a Fran, por ser el mejor monologuista-repartidor.

También quiero agradecer a todos los amigos que he hecho en la carrera, en el máster y en la vida. Aunque con muchos no quedo tanto como me gustaría sé que siempre estáis ahí y que por mucho tiempo que pase seguiremos siendo amigos.

A las de mi *kuadrila*, porque cuento con vosotras desde que tengo uso de razón y sé que siempre seguirá siendo así. Porque no me puedo imaginar mi vida sin vosotras y porque somos una familia de amigas. Y lo mejor de todo, por todo lo que nos espera juntas.

A mi familia de parte de madre y padre, que cada día es más grande. Porque los amigos se eligen, pero la familia no, y yo no he podido tener más suerte. Por toooodas las comidas familiares que tenemos y porque en cada una de ellas me demostráis las buenas personas que sois y hacéis que me sienta muy orgullosa. (*Eskerrik asko danori. Asko maite zaituztet*). En especial, quiero agradecer a Ianire. Porque hemos crecidos juntas, como hermanas y

amigas, compartiendo todo. Porque el triunfo de una es el triunfo de la otra y por ser tan buena persona.

A mi familia de Cuenca (Marisol, Cristina, Luises, Antonia...) Porque desde el primer día me he sentido como en casa y me habéis tratado como una más. Por esas comidas, paseos por el campo o charlas que hacen que siempre tenga ganas de veros.

A Mikel, mi hermano. Aunque hace tiempo que nos separan muchos kilómetros siempre estás ahí. Por todo lo que me has enseñado, por haber sido un buen ejemplo a seguir. Por ser trabajador, constante y luchador y por la familia que has formado con Yisela y Anke.

A mis padres. Esta tesis es para vosotros. Por haberme enseñado tanto y tan bien. Por estar siempre a mi lado, escuchando y ayudando, pero aceptando cada uno de mis pasos. Por haberme enseñado desde el respeto y el amor. Estoy muy orgullosa de vosotros, por ser buenas personas, nobles y trabajadores. Os quiero mucho y quiero que sepáis que no podría haber tenido mejores padres.

A Luis. Siempre me gusta escucharte cuando cuentas que los dos hicimos el máster por distintas casualidades y que ahí nos conocimos, como si del destino se tratara. Tengo muchas cosas que agradecerte, por todo lo que me has enseñado y por todo lo que hemos aprendido juntos. Por ser generoso, buena persona y por la vitalidad que tienes. Te quiero.



**Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:**

- **Oguiza A**, Recio C, Lazaro I, Mallavia B, Blanco J, Egido J, Gomez-Guerrero C. Peptide-based inhibition of I $\kappa$ B kinase/nuclear factor- $\kappa$ B pathway protects against diabetes-associated nephropathy and atherosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2015 Apr 28.
- Recio C\*, **Oguiza A\***, Mallavia B, Lazaro I, Ortiz-Muñoz G, Lopez-Franco O, Egido J, Gomez-Guerrero C. Gene delivery of suppressors of cytokine signaling (SOCS) inhibits inflammation and atherosclerosis development in mice. *Basic Res Cardiol.* 2015 Mar;110(2):8. (\* These authors contributed equally to this work).

**Otras publicaciones conseguidas durante el desarrollo de esta tesis:**

- Lázaro I, **Oguiza A**, Recio C, Mallavia B, Madrigal-Matute J, Blanco J, Egido J, Martín-Vantura JL, Gómez-Guerrero C. Targeting HSP90 ameliorates nephropathy and atherosclerosis through suppression of NF- $\kappa$ B and STAT signalling pathways in diabetic mice. *Diabetes* (en revisión).
- Recio C, **Oguiza A**, Lázaro I, Mallavia B, Egido J, Gómez-Guerrero C. Suppressor of cytokine signaling 1-derived peptide inhibits Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway and improves inflammation and atherosclerosis in diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Sep;34(9):1953-60.
- Mallavia B, **Oguiza A**, López-Franco O, Recio C, Ortiz-Muñoz G, Lázaro I, López-Parra V, Egido J, Gómez-Guerrero C. Gene deficiency in activating Fc $\gamma$  receptors influences the macrophage phenotypic balance and reduces atherosclerosis in mice. *PLoS One.* 2013 Jun 21;8(6):e66754.
- Mallavia B, Recio C, **Oguiza A**, Ortiz-Muñoz G, Lázaro I, López-Parra V, López-Franco O, Schindler S, Depping R, Egido J, Gómez-Guerrero C. Peptide inhibitor of Nuclear Factor- $\kappa$ B translocation ameliorates experimental atherosclerosis. *Am J Pathol.* 2013 May;182(5):1910-21.
- Lopez-Parra V, Mallavia B, Lopez-Franco O, Ortiz-Muñoz G, **Oguiza A**, Recio C, Blanco J, Nimmerjahn F, Egido J, Gomez-Guerrero C. Fc $\gamma$  receptor deficiency attenuates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012 Sep;23(9):1518-27.



La diabetes es una enfermedad crónica de gran impacto socio-sanitario debido a su elevada frecuencia y a las consecuencias de sus complicaciones crónicas. Entre ellas, la nefropatía y la aterosclerosis son principal causa de enfermedad renal crónica y morbimortalidad en los pacientes diabéticos, aunque en la actualidad no existen alternativas terapéuticas que frenen de forma efectiva la aparición de eventos cardiovasculares o la progresión a insuficiencia renal. La inflamación es un proceso clave en la patogenia del daño renal y vascular en la diabetes y en ella participan numerosas proteínas inflamatorias, cuya expresión está estrictamente regulada a nivel intracelular por diversos mecanismos. En esta tesis hemos estudiado el potencial terapéutico de dos vías intracelulares activadas durante el inicio y progresión de la nefropatía diabética y la aterosclerosis: NF- $\kappa$ B (factor nuclear- $\kappa$ B) y JAK/STAT (Janus quinasa/Transductor de la señal y activador de la transcripción).

En la primera parte, analizamos las consecuencias funcionales de inhibir específicamente la ruta NF- $\kappa$ B dependiente de la I $\kappa$ B quinasa (IKK) en un modelo experimental de nefropatía y aterosclerosis asociadas a diabetes, inducido por inyección de estreptozotocina en ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>). Para ello, empleamos un péptido con permeabilidad celular y que bloquea la formación del complejo IKK. El tratamiento con el péptido inhibidor no afectó a la hiperglucemia ni al perfil lipídico de los ratones diabéticos pero mejoró su función renal, reduciendo significativamente las lesiones renales (expansión mesangial, fibrosis e infiltrado), la actividad NF- $\kappa$ B y la expresión de genes proinflamatorios y profibróticos. El péptido también suprimió la actividad NF- $\kappa$ B en la aorta de los ratones diabéticos, redujo el tamaño de las placas de ateroma y su contenido lipídico e inflamatorio (leucocitos y citoquinas) y aumentó los componentes de estabilización (colágeno y células de músculo liso vascular). *In vitro*, el péptido bloqueó la interacción entre las subunidades IKK $\gamma$  e IKK $\alpha/\beta$  y previno la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y la expresión de genes controlados por este factor, así como la proliferación celular en condiciones de hiperglucemia e inflamación.

En la segunda parte, investigamos el efecto ateroprotector de la inhibición de JAK/STAT en ratones apoE<sup>-/-</sup> mediante terapia génica con un adenovirus que codifica la proteína SOCS3 (supresora de la señal de citoquinas 3). La expresión del transgen SOCS3 atenuó la activación de STAT1 y STAT3 en aorta, redujo la expresión de sus genes dependientes (citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión y receptores *scavenger*) y previno el desarrollo de aterosclerosis en fases tempranas. Además, la terapia con SOCS3 promovió un fenotipo de placa más estable, caracterizado por un menor contenido de lípidos, células T y macrófagos M1 y un incremento de macrófagos M2 y colágeno. Sin embargo, la expresión de SOCS3 no consiguió frenar la progresión de las lesiones ateroscleróticas en fases más avanzadas del modelo animal. A nivel sistémico, la terapia con SOCS3 redujo la expresión de citoquinas de respuesta linfocitaria Th1 y Th17 y el estado de activación de los monocitos circulantes. *In vitro*, SOCS3 inhibió la activación de STAT inducida por citoquinas en células vasculares y macrófagos, la expresión de genes proinflamatorios y la proliferación.

En conclusión, nuestros estudios demuestran el efecto renoprotector y antiaterosclerótico de la inhibición selectiva de las vías NF- $\kappa$ B y JAK/STAT en modelos experimentales y proporcionan las bases para el desarrollo racional de nuevas terapias, aportando así un enfoque viable contra las complicaciones inflamatorias de la diabetes.



Diabetes is a chronic disease with a high social and clinical impact because of its high frequency and the consequences of its chronic complications. Among them, nephropathy and atherosclerosis are the leading cause of chronic kidney disease and morbidity and mortality in diabetic patients, although currently there are no therapeutic alternatives that effectively stop the occurrence of cardiovascular events or the progression to kidney failure. The inflammatory response associated to diabetic complications is mediated by numerous inflammatory proteins, whose gene expression is strictly regulated by several intracellular mechanisms. In this thesis we have studied the therapeutic potential of two intracellular pathways activated during the initiation and progression of diabetic nephropathy and atherosclerosis: NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) and JAK/STAT (Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription).

In the first part, we analyzed the functional consequences of inhibiting specifically the I $\kappa$ B kinase (IKK)-dependent NF- $\kappa$ B pathway in an experimental model of diabetic nephropathy and atherosclerosis, the streptozotocin-induced diabetic apolipoprotein E deficient mouse (apoE<sup>-/-</sup>). For that, we used a cell permeable peptide that blocks the formation of the IKK complex. Treatment with the inhibitory peptide did not affect hyperglycemia and lipid profile in diabetic mice but improved their renal function by attenuating renal lesions (mesangial expansion, fibrosis and infiltrate), NF- $\kappa$ B activity and the expression of proinflammatory and profibrotic genes. Peptide administration also suppressed the NF- $\kappa$ B activity in diabetic mouse aortas, reduced the size, lipid content and inflammation (leucocytes and cytokines) in atherosclerotic lesions, while increasing plaque stabilization markers (collagen and vascular smooth muscle cells). *In vitro*, the peptide blocked the interaction between IKK $\gamma$  and IKK $\alpha/\beta$  subunits, thus preventing nuclear translocation of NF- $\kappa$ B, target gene expression, and cell proliferation induced by hyperglycemic and inflammatory conditions.

In the second part, we investigated the atheroprotective effect of JAK/STAT inhibition in apoE<sup>-/-</sup> mice by gene therapy with recombinant adenovirus encoding the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3). SOCS3 transgene expression in aorta attenuated STAT1 and STAT3 activation and the expression of STAT-dependent genes (cytokines, chemokines, adhesion molecules and scavenger receptors), therefore preventing the development of atherosclerosis in early phases. Furthermore, SOCS3 gene delivery promoted a more stable plaque phenotype characterized by lower content of lipids, T cells and M1 macrophages and higher content of M2 macrophages and collagen. However, SOCS3 expression was not able to halt the progression of advanced lesions in atherosclerotic mice. Systemically, SOCS3 gene therapy inhibited the expression of Th1 and Th17 cytokines and reduced the activation state of circulating monocytes. *In vitro*, SOCS3 prevented cytokine-induced STAT activation, pro-inflammatory gene expression and cell proliferation in vascular cells and macrophages.

In conclusion, our studies demonstrate the renoprotective and antiatherosclerotic effect of the selective inhibition of NF- $\kappa$ B and JAK/STAT pathways in experimental models and provide the basis for the rational development of new therapies, thus providing a feasible approach against the inflammatory complications of diabetes.

## ABREVIATURAS

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                                                     | <b>1</b>  |
| 1. DIABETES MELLITUS                                                       | 1         |
| 2. NEFROPATÍA DIABÉTICA                                                    | 2         |
| 2.1. Mecanismos y mediadores implicados en la nefropatía diabética         | 3         |
| 2.1.1. Hiperglucemia y sistema renina-angiotensina                         | 3         |
| 2.1.2. Inflamación                                                         | 4         |
| 2.1.3. Proliferación, hipertrofia y fibrosis                               | 5         |
| 2.1.4. Efecto de la dislipidemia                                           | 6         |
| 3. ATHEROSCLEROSIS                                                         | 7         |
| 3.1. Mecanismos y mediadores implicados en la aterosclerosis               | 8         |
| 3.1.1. Factores de riesgo                                                  | 8         |
| 3.1.2. Dislipidemia                                                        | 9         |
| 3.1.3. Inflamación                                                         | 9         |
| 3.1.4. Hiperglucemia                                                       | 12        |
| 4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA INFLAMACIÓN RENAL Y VASCULAR | 13        |
| 4.1. La vía NF- $\kappa$ B                                                 | 13        |
| 4.1.1. Vías de activación de NF- $\kappa$ B                                | 13        |
| 4.1.2. Implicación de NF- $\kappa$ B en las complicaciones diabéticas      | 15        |
| 4.2. La vía JAK/STAT                                                       | 16        |
| 4.2.1. Regulación de la vía JAK/STAT: proteínas SOCS                       | 18        |
| 4.2.2. Implicación de la vía JAK/STAT en el daño renal y vascular          | 19        |
| <b>II.OBJETIVOS</b>                                                        | <b>23</b> |
| <b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>                                             | <b>27</b> |
| 1. ESTÍMULOS                                                               | 27        |
| 2. DISEÑO DEL PÉPTIDO NBD                                                  | 27        |
| 3. PURIFICACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES                                | 28        |

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Purificación de adenovirus.....                                                 | 28 |
| 3.2. Titulación vírica.....                                                          | 28 |
| 4. CULTIVOS CELULARES.....                                                           | 29 |
| 4.1. Cultivos primarios.....                                                         | 29 |
| 4.2. Líneas celulares.....                                                           | 30 |
| 4.3. Ensayo de viabilidad y proliferación celular.....                               | 30 |
| 5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....                                                        | 30 |
| 5.1. Extracción de proteínas totales y nucleares. ....                               | 30 |
| 5.2. Inmunoprecipitación y Western blot.....                                         | 31 |
| 5.3. Inmunofluorescencia en células.....                                             | 32 |
| 5.4. Ensayo de gen reportero.....                                                    | 33 |
| 5.5. ELISA.....                                                                      | 33 |
| 6. ANÁLISIS DE RNA.....                                                              | 33 |
| 6.1. Extracción de RNA.....                                                          | 33 |
| 6.2. PCR cuantitativa a tiempo real.....                                             | 34 |
| 7. MODELOS EXPERIMENTALES.....                                                       | 35 |
| 7.1. Animales empleados.....                                                         | 35 |
| 7.2. Modelo experimental de nefropatía y aterosclerosis aceleradas por diabetes..... | 35 |
| 7.3. Modelo experimental de aterosclerosis.....                                      | 36 |
| 7.4. Análisis bioquímico.....                                                        | 37 |
| 7.5. Procesamiento de los tejidos.....                                               | 37 |
| 7.6. Citometría de flujo.....                                                        | 38 |
| 8. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....                                                         | 38 |
| 8.1. Histología e inmunohistoquímica en riñón.....                                   | 38 |
| 8.2. Histología e inmunohistoquímica en aorta.....                                   | 39 |
| 8.3. Southwestern <i>in situ</i> .....                                               | 41 |
| 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....                                                         | 42 |

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>IV. RESULTADOS</b>                                                                                                                                                       | 45 |
| <b>PARTE I: MODULACIÓN ESPECÍFICA DE LA ACTIVIDAD INFLAMATORIA DE NF-<math>\kappa</math>B EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROPATÍA Y ATEROSCLEROSIS ASOCIADAS A DIABETES</b> | 45 |
| 1. ACCIONES <i>IN VITRO</i> DEL PÉPTIDO INHIBIDOR NBD                                                                                                                       | 45 |
| 1.1. Inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B por el péptido NBD                                                                                                       | 46 |
| 1.2. Inhibición de genes dependientes de NF- $\kappa$ B por el péptido NBD                                                                                                  | 48 |
| 2. EFECTOS <i>IN VIVO</i> DEL PETIDO NBD EN LA DIABETES EXPERIMENTAL                                                                                                        | 50 |
| 2.1. Evolución del modelo de diabetes experimental en ratones apoE <sup>-/-</sup>                                                                                           | 50 |
| 2.2. El tratamiento con el péptido NBD atenúa el daño renal inducido por la diabetes experimental                                                                           | 52 |
| 2.3. La terapia con el péptido NBD limita el desarrollo de aterosclerosis en los ratones diabéticos                                                                         | 56 |
| 2.4. El tratamiento con NBD altera la composición de las placas de ateroma y reduce la inflamación sistémica                                                                | 57 |
| 2.5. El tratamiento con el péptido inhibidor bloquea de manera efectiva la activación de NF- $\kappa$ B inducida por diabetes                                               | 60 |
| <b>PARTE II: INHIBICIÓN CONSTITUTIVA DE LA VÍA JAK/STAT EN LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL MEDIANTE TERAPIA GÉNICA CON SOCS3</b>                                             | 63 |
| 1. ACCIONES <i>IN VIVO</i> DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ADENOVIRUS SOCS3 EN LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL                                                                      | 63 |
| 1.1. Transferencia del gen SOCS3 en ratones ateroscleróticos                                                                                                                | 63 |
| 1.2. La administración del gen SOCS3 inhibe la activación de STAT y reduce la aterosclerosis en el modelo experimental                                                      | 64 |
| 1.3. Alteraciones en la composición de la placa aterosclerótica de los ratones tratados con adenovirus SOCS3                                                                | 68 |
| 1.4. La sobre-expresión de SOCS3 reduce la inflamación vascular y sistémica en los ratones ateroscleróticos                                                                 | 70 |
| 2. ACCIONES <i>IN VITRO</i> DEL ADENOVIRUS SOCS3                                                                                                                            | 74 |

|                                                                                                                                                                                  |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>V. DISCUSIÓN.....</b>                                                                                                                                                         | <b>79</b>  |
| <b>PARTE I: MODULACIÓN ESPECÍFICA DE LA ACTIVIDAD INFLAMATORIA DE NF-<math>\kappa</math>B EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROPATÍA Y ATEROSCLEROSIS ASOCIADAS A DIABETES.....</b> | <b>79</b>  |
| <b>PARTE II: INHIBICIÓN CONSTITUTIVA DE LA VÍA JAK/STAT EN LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL MEDIANTE TERAPIA GÉNICA CON SOCS3.....</b>                                             | <b>87</b>  |
| <b>VI. CONCLUSIONES.....</b>                                                                                                                                                     | <b>95</b>  |
| <b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                                                                                                                                    | <b>99</b>  |
| <b>VIII. ANEXOS.....</b>                                                                                                                                                         | <b>115</b> |

**Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.**

|        |                                                    |
|--------|----------------------------------------------------|
| Ad     | Adenovirus                                         |
| AGE    | Productos de glicosilación avanzada                |
| ALT    | Alanina aminotransferasa                           |
| AngII  | Angiotensina II                                    |
| APC    | Aloficocianina                                     |
| ApoE   | Apolipoproteína E                                  |
| Arg    | Arginasa                                           |
| AST    | Aspartato aminotransferasa                         |
| BCA    | Ácido bicinconínico                                |
| BCIP   | 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato de p-toluidina   |
| BSA    | Albúmina de suero bovino                           |
| CCL    | Ligando de quimioquina con motivo CC               |
| CCR    | Receptor de ligando de quimioquina con motivo CC   |
| CIS    | Proteína SH2 inducible por citoquinas              |
| CM     | Célula mesangial                                   |
| CMLV   | Célula de músculo liso vascular                    |
| Cy7    | Cianina 7                                          |
| DAB    | Tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina          |
| DAPI   | 4',6-diamidino-2-fenilindol                        |
| DCCT   | Estudio "Diabetes Control and Complications Trial" |
| DPX    | Resina acrílica con base de xileno                 |
| EEM    | Error estándar de la media                         |
| FITC   | Isotiocianato de fluoresceína                      |
| GAS    | Secuencia activada gamma                           |
| GFP    | Proteína verde fluorescente                        |
| GHbA1c | Hemoglobina glicosilada                            |
| HDL    | Lipoproteína de alta densidad                      |
| HEK    | Células de riñón embrionario humano                |
| HG     | Alta concentración de glucosa                      |
| HRP    | Peroxidasa de rábano                               |

|                |                                                         |
|----------------|---------------------------------------------------------|
| ICAM-1         | Molécula de adhesión intercelular-1                     |
| IFN $\gamma$   | Interferón $\gamma$                                     |
| I $\kappa$ B   | Inhibidor de NF- $\kappa$ B                             |
| IKK            | I $\kappa$ B quinasa                                    |
| IL-1           | Interleuquina-1                                         |
| JAK            | Janus quinasa                                           |
| KIM-1          | Molécula de daño renal-1                                |
| KIR            | Región inhibidora de quinasa                            |
| LDL            | Lipoproteína de baja densidad                           |
| LPS            | Lipopolisacárido bacteriano                             |
| MAPK           | Quinasa activada por mitógenos                          |
| MCT            | Línea de células epiteliales de túbulo renal proximal   |
| MTT            | 1-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-3,5-difenilformazan         |
| Mut            | Mutante                                                 |
| N.d.           | No determinado                                          |
| NBD            | Dominio de unión a NEMO                                 |
| NBT            | Cloruro de nitroazul de tetrazolio                      |
| NEMO           | Modulador esencial de NF- $\kappa$ B                    |
| NF- $\kappa$ B | Factor nuclear- $\kappa$ B                              |
| NIK            | Quinasa inductora de NF- $\kappa$ B                     |
| NO             | Óxido nítrico                                           |
| PAS            | Ácido periódico de Schiff                               |
| PDGF           | Factor de crecimiento derivado de las plaquetas         |
| PE             | Ficoeritrina                                            |
| Pfu            | Unidades formadoras de placa                            |
| PKC            | Proteína quinasa C                                      |
| PRR            | Peso renal relativo                                     |
| PVDF           | Fluoruro de polivinilideno                              |
| SCr            | Creatinina sérica                                       |
| SFB            | Suero fetal bovino                                      |
| SH2            | Dominio de homología Src-2                              |
| SOCS           | Proteína supresora de la señal de citoquinas            |
| STAT           | Transductor de la señal y activador de la transcripción |
| STZ            | Estreptozotocina                                        |

|              |                                              |
|--------------|----------------------------------------------|
| TG           | Triglicérido                                 |
| TGF- $\beta$ | Factor de crecimiento transformante- $\beta$ |
| Th           | Linfocito T cooperador                       |
| TMB          | 3,3',5,5'-tetrametilbencidina                |
| TNF $\alpha$ | Factor de necrosis tumoral $\alpha$          |
| Treg         | Linfocito T regulador                        |
| U.a.         | Unidades arbitrarias                         |
| UAC          | Relación albúmina/creatinina en orina        |
| VCAM-1       | Molécula de adhesión vascular-1              |
| VEGF         | Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| VLDL         | Lipoproteína de muy baja densidad            |



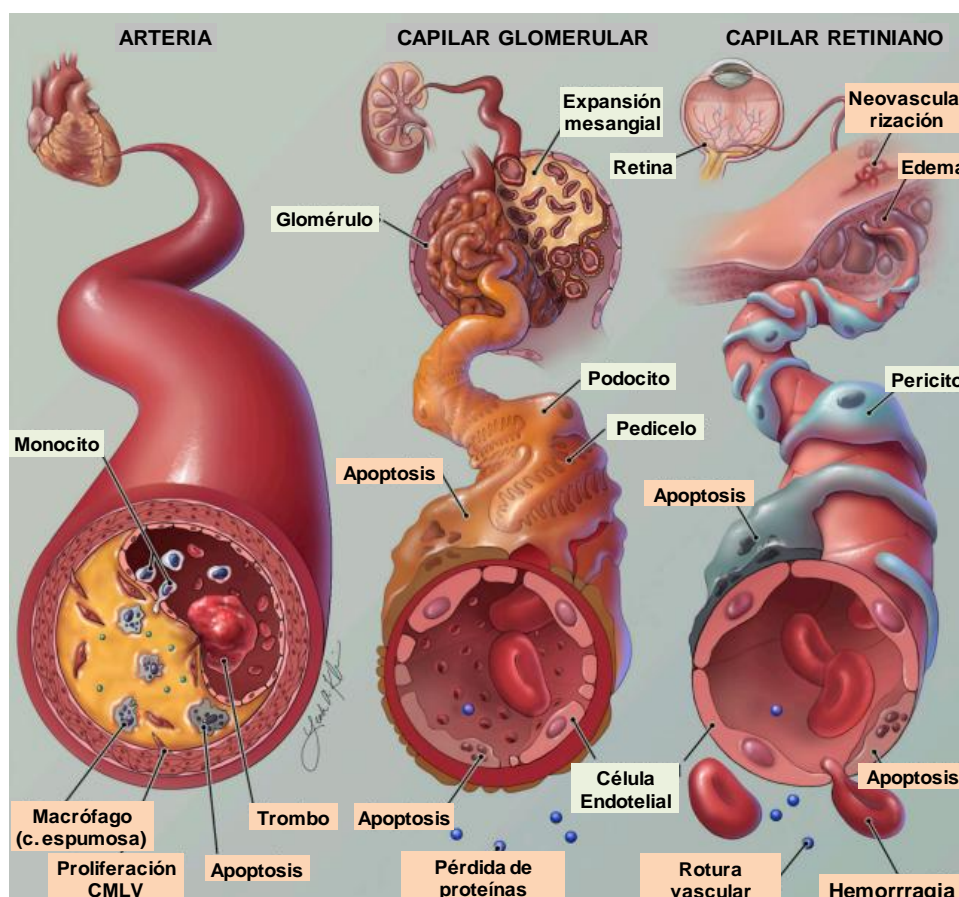


# **I.INTRODUCCIÓN**



## 1. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica como resultado de un defecto en la secreción de insulina, en su acción o ambos, acompañada de alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. La diabetes puede clasificarse como tipo 1 (destrucción autoinmune de células  $\beta$  y deficiencia absoluta de insulina), tipo 2 (deficiencia y resistencia relativa a insulina) y otros tipos (como enfermedad pancreática) (1). Según la Organización Mundial de la Salud se está convirtiendo en una epidemia mundial, con más de 347 millones de personas con diabetes en el año 2014. Se estima que en los próximos 10 años las muertes por diabetes aumentarán más de un 50%, siendo en el año 2030 la séptima causa mundial de muerte, con unos 430 millones de diabéticos (2). El elevado impacto socio-sanitario de esta patología se debe a su alta frecuencia y, sobre todo, a las consecuencias de sus complicaciones crónicas, tanto microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) (**figura 1**) como macrovasculares (enfermedad cardíaca, cerebral y enfermedad vascular periférica) (3). El aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares es una de las causas principales de enfermedad y muerte prematura en la mayoría de los países, siendo responsable del 50-80% de las muertes de pacientes diabéticos.



**Figura 1.** Cambios histopatológicos durante el desarrollo de aterosclerosis, nefropatía y retinopatía en la diabetes. Modificado de Rask-Madsen *et al.* (3).

## 2. NEFROPATÍA DIABÉTICA

El riñón, órgano encargado de eliminar los productos tóxicos del metabolismo, está formado por alrededor de un millón de nefronas. La estructura de la nefrona se compone de una región globosa denominada corpúsculo de Malpighi (que contiene el glomérulo) en comunicación con un túbulo renal. El glomérulo es el encargado de la filtración sanguínea y está formado por una red capilar rodeada de células endoteliales, una región central formada por células mesangiales y los podocitos que componen la membrana basal, y la capa parietal que forma la cápsula de Bowman. El sistema tubular, formado por el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle y el túbulo contorneado distal, es el encargado de transportar y transformar la orina.

La mayoría de las enfermedades renales atacan a las nefronas provocando una pérdida gradual de su capacidad de filtración, lo que desencadena una insuficiencia renal crónica. Las principales causas de enfermedad renal crónica son la hipertensión arterial y la diabetes. La nefropatía es una complicación microvascular común de la diabetes y en los países desarrollados es causa principal de diálisis y trasplante (4). El desarrollo de nefropatía diabética se vincula con un gran incremento de la morbilidad y mortalidad prematura en estos pacientes y se estima que aproximadamente un 20% desarrollará nefropatía (5).

Desde el punto de vista estructural, la nefropatía diabética se caracteriza por cambios en el riñón que incluyen la hipertrofia glomerular y el engrosamiento de las membranas glomerular, tubular y basal por acumulación de matriz extracelular, lo que causa finalmente fibrosis y esclerosis túbulointersticial y glomerular (6). Ultraestructuralmente, hay pérdida de podocitos y reducción en la fenestración de las células endoteliales. En cuanto a la funcionalidad, se produce pérdida de la tasa de filtración glomerular y excreción urinaria de albúmina en cantidades patológicas, conocida como microalbuminuria (albuminuria persistente a niveles de 30-299 mg/24 horas) en las fases iniciales y como macroalbuminuria (albuminuria persistente  $\geq 300$  mg/24 horas) en las avanzadas (1).

Son muchos los mecanismos que contribuyen a la patogenia de la nefropatía diabética, destacando la interacción entre los cambios metabólicos y hemodinámicos inducidos por la hiperglucemia y la predisposición genética como sus causas principales (4). Sin embargo, evidencias recientes demuestran que los mecanismos inmunológicos e inflamatorios juegan un papel importante en el inicio y progresión de la enfermedad. De hecho, tanto las células inmunes (monocitos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos) como los mediadores inflamatorios que éstas producen (quimioquinas, citoquinas, enzimas, factores de

crecimiento, etc.) regulan numerosos procesos patológicos relacionados con la nefropatía diabética, como proliferación y diferenciación celular, apoptosis, estrés oxidativo, migración y síntesis de proteínas de matriz extracelular (7, 8).

El estudio conocido como DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) demostró que un control estricto de la glucemia retrasa el comienzo de la diabetes y sus complicaciones macro y microvasculares, incluida la nefropatía diabética (8). Hoy en día las terapias de nefropatía diabética se centran en controlar la presión sanguínea, reducir la proteinuria y retardar la pérdida de función renal, para lo que se emplean habitualmente inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o bloqueantes de los receptores tipo 1 de angiotensina II (AngII), por sus efectos antialbuminúricos y antihipertensivos (2). Sin embargo, estas terapias no siempre previenen la progresión final de la enfermedad. Por lo tanto, sería importante un control óptimo de los niveles de glucosa y lípidos (reducción del peso corporal), además del uso de nuevos agentes antidiabéticos (como las incretinas), de estatinas o incluso de terapias más específicas contra la nefropatía diabética.

## **2.1. Mecanismos y mediadores implicados en la nefropatía diabética**

### **2.1.1. Hiperglucemia y sistema renina-angiotensina**

La mayoría de las células, cuando están expuestas a condiciones de hiperglucemia, son capaces de reducir el transporte de la glucosa al interior de la célula, de manera que su concentración intracelular se mantiene constante. Sin embargo, la exposición crónica a elevada glucosa daña irreversiblemente algunas células (como endoteliales y mesangiales) y no son capaces de disminuir este transporte, produciéndose hiperglucemia intracelular (9).

La hiperglucemia altera diversas rutas metabólicas en las células renales. En primer lugar se generan productos de glicosilación avanzada (AGE) que inducen daño a través de la unión a sus receptores celulares. También se activa la ruta de la proteína quinasa C (PKC), lo que disminuye la óxido nítrico (NO) sintasa y aumenta la expresión de factores fibrogénicos e inflamatorios. Por último, la acumulación excesiva de sorbitol en la ruta del poliol produce aumento de AGE, estrés oxidativo, activación de PKC y acumulación de matriz extracelular, lo que conduce finalmente al incremento del volumen mesangial y al engrosamiento de la membrana basal (10).

Otra de las consecuencias de la hiperglucemia son los cambios hemodinámicos, los cuales producen un aumento en la presión sistémica e intraglomerular mediado por diversos factores vasoactivos como AngII, NO y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

El sistema renina-angiotensina es importante en la regulación de la presión sanguínea y la homeostasis de fluidos y electrolitos. Su principal péptido efector es AngII, que influye de dos formas en el daño tisular por hiperglucemia: provocando un incremento de la proliferación celular y de la síntesis de citoquinas, factores de crecimiento y proteínas de matriz extracelular; o bien interactuando con los principales mecanismos bioquímicos del tejido renal dañado por la diabetes, como pueden ser la generación de AGE, el incremento de las vías de la hexosaminasa o el poliol, la activación de PKC o el estrés oxidativo, constituyendo así un bucle de retroalimentación positiva para todos estos mecanismos (11).

### **2.1.2. Inflamación**

Cada vez más evidencias sugieren que la inflamación es un factor clave en la patogénesis de la nefropatía diabética. Desde las fases tempranas de la enfermedad se produce acumulación de macrófagos y células T en el glomérulo y el espacio túbulointersticial. Estos leucocitos se adhieren al endotelio con la ayuda de las selectinas y producen moléculas proinflamatorias (moléculas de adhesión, citoquinas y quimioquinas) que promueven el reclutamiento de nuevas células, así como la activación de las células residentes renales, que a su vez producen factores implicados en la migración leucocitaria y la proliferación. De esta manera se inicia un círculo vicioso de amplificación del proceso inflamatorio que agrava y perpetúa el daño renal inicial (12).

Las moléculas de adhesión son proteínas involucradas en la unión entre células o con la matriz extracelular durante los procesos de adhesión celular. En primer lugar actúan las selectinas, que son las encargadas de anclar y reducir la velocidad circulante de los leucocitos del vaso. A continuación, la fuerte adhesión de leucocitos al endotelio está mediada por las moléculas de adhesión intercelulares (ICAM-1) y vasculares (VCAM-1). Diferentes estudios muestran un aumento significativo de la expresión de moléculas de adhesión en modelos de nefropatía diabética (13-16).

Entre las diversas citoquinas inflamatorias implicadas en el daño renal asociado a diabetes destacan la interleuquina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Se ha demostrado que IL-1 aumenta en el daño renal experimental y es capaz de inducir la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, mesangiales y túbuloepiteliales y la migración de leucocitos (16). Por su parte, TNF $\alpha$  es producida mayoritariamente por monocitos, macrófagos y células T y también por las células residentes renales. Estudios experimentales han relacionado el aumento de TNF $\alpha$  en células glomerulares y tubulares de ratas diabéticas

con la hipertrofia y la hiperfuncionalidad renal, dos alteraciones de la etapa inicial de la nefropatía diabética (7).

Las quimioquinas son pequeñas citoquinas quimiotácticas que estimulan la migración dirigida de leucocitos y participan en procesos de angiogénesis, desarrollo embrionario y homeostasis celular, así como en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes (17). Dentro de esta familia se distinguen cuatro subfamilias, en función de la disposición de sus dos primeros residuos de cisteína: C (p. ej. XCL1 y XCL2), CC (p. ej. CCL2 y CCL5), CXC (p. ej. IL-8 y CX3C) y CX<sub>3</sub>C (p. ej. CX<sub>3</sub>CL1). La proteína quimiotáctica de monocitos-1, también conocida como CCL2 o MCP-1, es la principal quimioquina de la subfamilia CC, con un amplio espectro de acción y potente capacidad quimiotáctica para monocitos y linfocitos T. Además induce en monocitos la expresión de integrinas, favoreciendo su migración (18). Se ha observado que los niveles de CCL2 están aumentados en células glomerulares en cultivo así como en el tejido renal y la orina de pacientes renales y modelos experimentales, en correlación con el infiltrado inflamatorio y las lesiones renales (19). Otra quimioquina importante es CCL5 o RANTES, un factor quimiotáctico para células T, eosinófilos y basófilos, que se expresa en varios tipos celulares renal (mesangiales glomerulares y túbuloepiteliales) y cuyos niveles se encuentran elevados en modelos experimentales y pacientes con diabetes (16, 20).

### **2.1.3. Proliferación, hipertrofia y fibrosis**

Los cambios glomerulares más frecuentes en pacientes con nefropatía diabética incluyen la proliferación e hipertrofia de células mesangiales glomerulares, la acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular y el engrosamiento de la membrana basal glomerular. Los cambios en el compartimento túbulointersticial comprenden la hipertrofia tubular, el engrosamiento de la membrana basal tubular y la fibrosis intersticial (21, 22).

Además de hiperglucemia y AngII, diversos factores de crecimiento están implicados tanto en los procesos proliferativos de la fase temprana de la diabetes (p. ej. factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), VEGF y factor de crecimiento insulínico tipo 1), como en la transición a hipertrofia renal de las fases avanzadas (p. ej. factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ )) (23). Los niveles circulantes de estos factores de crecimiento aumentan en la diabetes humana, y su inhibición en modelos experimentales mejora las alteraciones funcionales y estructurales que se producen por la diabetes, lo que sugiere un papel deletéreo de estas proteínas en la fisiopatología de la diabetes (23, 24).



La progresión de la nefropatía diabética acaba provocando una fibrosis renal crónica por acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular (p. ej. fibronectina, laminina y colágenos tipo I, III y IV), causada tanto por el aumento de su síntesis como por la disminución de su degradación (25). Las principales células efectoras responsables del depósito excesivo de matriz extracelular son las células mesangiales, las túbuloepiteliales y los fibroblastos intersticiales. TGF- $\beta$  es un mediador clave en este proceso, ya que estimula la síntesis de proteínas de matriz extracelular, disminuye su degradación por las metaloproteasas (26) y además promueve la transición epitelio-mesénquima (formación de miofibroblastos productores de matriz extracelular) (27, 28). En pacientes con nefropatía diabética y en modelos animales se ha observado un aumento en los niveles de TGF- $\beta$ , tanto en orina como en tejido renal (29-31). Además, el tratamiento experimental con anticuerpos anti-TGF- $\beta$  mejoró la fibrosis y la función renal en animales diabéticos (32).

#### **2.1.4. Efecto de la dislipidemia**

Los pacientes con diabetes presentan muy frecuentemente dislipidemia como resultado de alteraciones en el metabolismo lipídico, lo que contribuye a elevar su riesgo de enfermedad cardiovascular y mortalidad (2). En pacientes con diabetes tipo 1, los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL) son normales, pero los de triglicéridos están elevados, comúnmente asociados con un mal control de la glucemia. Este perfil alterado de lípidos puede deberse a la deficiencia de insulina, con la consiguiente reducción de la actividad de la lipoproteína lipasa y la disminución de la capacidad de aclaramiento de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). En cambio, los pacientes con diabetes tipo 2 a menudo presentan una disminución del colesterol HDL y un cambio en las partículas LDL hacia las partículas VLDL más aterogénicas, como consecuencia del aumento de la producción hepática. Este proceso es incrementado por la resistencia a la insulina, reduciendo el aclaramiento de VLDL y quilomicrones (33).

Existen varios mecanismos por los que la dislipidemia podría conducir a nefropatía diabética. Así, las lipoproteínas ricas en triglicéridos estimulan, a través de la expresión de TGF- $\beta$ , la producción de especies reactivas de oxígeno y el aumento de proteínas de matriz extracelular. También pueden activar los monocitos y afectar al glucocáliz celular, causando un aumento de la permeabilidad glomerular. Las formas oxidadas de lipoproteínas inhiben la vasodilatación mediada por NO y promueven la proliferación mesangial y la expresión de factores quimiotácticos de monocitos, contribuyendo así al daño glomerular. Estos efectos

adversos pueden ser revertidos por las HDL. De hecho, se ha descrito que niveles bajos de colesterol HDL pueden agravar el daño renal en pacientes con nefropatía diabética (34).

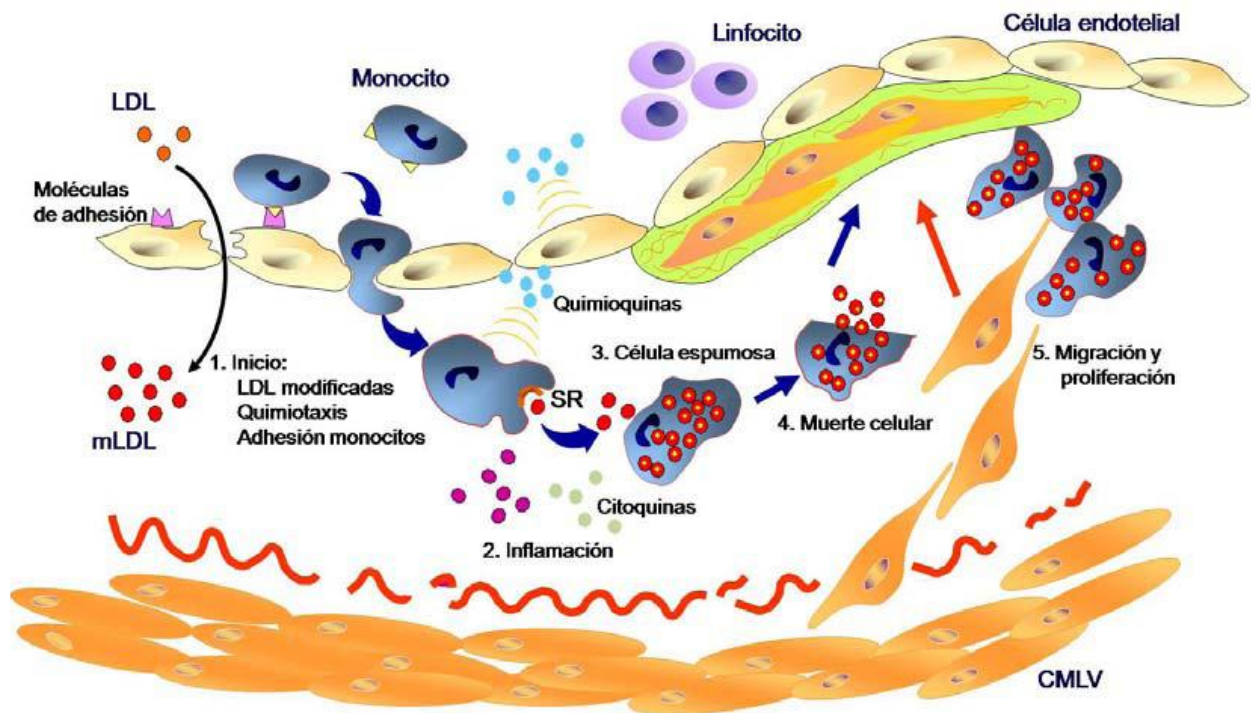
### 3. ATHEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una enfermedad caracterizada por el depósito en las paredes de las arterias de una placa formada por grasa, colesterol, calcio y otras sustancias de la sangre. Con el tiempo, la placa se endurece y estrecha las arterias, lo que limita el flujo de sangre rica en oxígeno a los órganos y a otras partes del cuerpo. Clásicamente considerada como un proceso de acumulación pasiva de colesterol, hoy en día la aterosclerosis se conoce como una enfermedad inflamatoria crónica. De hecho, la placa aterosclerótica se caracteriza por la acumulación de lípidos en la pared arterial, el infiltrado de leucocitos (principalmente macrófagos y linfocitos) y la formación de una capa fibrosa compuesta mayoritariamente por colágeno y producida por las células de músculo liso vascular (CMLV) (35) (**figura 2**).

Las arterias están formadas por tres capas concéntricas. La capa más interna o íntima, compuesta por células endoteliales, lámina basal y tejido conectivo subendotelial laxo, es la encargada del contacto con el medio interno, el torrente sanguíneo. A continuación la túnica media, formada por varias capas concéntricas de CMLV metabólicamente muy activas y responsables de la síntesis de la matriz extracelular. Por último, la capa externa o túnica adventicia, compuesta principalmente de colágeno y elastina, por la que circulan los vasos sanguíneos propios (*vasa vasorum*) que irrigan a los vasos sanguíneos de gran calibre como la aorta y en la que se encuentran las fibras nerviosas del vaso (36).

En la formación de la placa de ateroma participan distintos tipos celulares:

- Las **células endoteliales** constituyen la barrera más importante contra la trombosis. Por ello, su disfunción se traduce en una mayor atracción de células inflamatorias hacia el interior de la placa. Además, la falta de producción de NO favorece la adhesión plaquetaria.
- Los **macrófagos** juegan un papel importante en la inflamación no específica gracias a la secreción de citoquinas y concentran en su interior lípidos oxidados, convirtiéndose en células espumosas (37).
- Las **CMLV** de la capa media arterial son fundamentales a la hora de mantener la integridad de los vasos en condiciones fisiológicas, ya que producen colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. Sin embargo, las condiciones inflamatorias inducen cambios fenotípicos en las CMLV y favorecen su crecimiento y transformación en células espumosas, lo que contribuye al engrosamiento de la capa íntima (neointima) (38).



**Figura 2. Mecanismos inflamatorios implicados en la formación de la lesión aterosclerótica.**

En cuanto a los tipos de placas ateroscleróticas en humanos se pueden diferenciar dos: estables y vulnerables. Generalmente las placas estables, ricas en matriz extracelular y CMLV, suelen ser asintomáticas; mientras que las placas vulnerables son ricas en macrófagos y células espumosas y su capa fibrosa (matriz extracelular compuesta de colágeno y elastina) es más débil y propensa a la rotura (39). Los efectos más adversos de las placas ateroscleróticas se producen cuando se rompe esta cápsula fibrosa y el material trombogénico del núcleo necrótico entra en contacto con las proteínas coagulantes de la sangre. De esta manera se forman los trombos, compuestos por plaquetas agregadas y unidas a otros componentes séricos, y al ser liberados pueden producir diferentes efectos patológicos, como infarto de miocardio, ictus cerebral o tromboembolismo venoso (40).

### 3.1. Mecanismos y mediadores implicados en la aterosclerosis

#### 3.1.1. Factores de riesgo

Determinadas condiciones o hábitos pueden aumentar las probabilidades de desarrollar aterosclerosis. Los factores de riesgo más importantes son: hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia; hipertensión; resistencia a la insulina y diabetes; hábitos de vida (tabaco, falta de actividad física, sobrepeso, dieta no saludable, estrés y alcohol); edad; antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular; apnea del sueño e inflamación (41).

### 3.1.2. Dislipidemia

Un proceso clave en la aterogénesis es la acumulación y oxidación de las LDL en las células del vaso. Estas partículas contienen colesterol esterificado y triglicéridos rodeados por una capa compuesta de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteína Apo-B100 (35). Además del aumento de colesterol LDL, los pacientes con aterosclerosis muestran un mayor nivel de triglicéridos y un descenso en los niveles de colesterol HDL (42). En consecuencia, se reclutan monocitos circulantes a la capa íntima vascular, donde se diferencian y se activan. Los macrófagos activados expresan niveles elevados de receptores *scavenger* que median la absorción de LDL oxidadas, transformándose en células espumosas cargadas de lípidos. La acumulación excesiva de lípidos genera células apoptóticas y lípidos trombogénicos y favorece la secreción de mediadores inflamatorios en el lugar de la lesión (43, 44).

### 3.1.3. Inflamación

Una característica principal en el desarrollo de la aterosclerosis es la inflamación que se produce en las arterias, con acumulación de células inmunes y mediadores inflamatorios, lo que favorece el reclutamiento de más leucocitos, produciéndose así un bucle de inflamación crónica que agrava el proceso aterosclerótico.

Las lipoproteínas activan las células endoteliales y éstas producen mediadores inflamatorios que atraen monocitos, células dendríticas y células T a la íntima (35, 45). Los monocitos circulantes reducen su velocidad en el torrente sanguíneo mediante la unión a las células endoteliales y, una vez fuertemente adheridas a la pared del vaso, atraviesan la barrera endotelial en un efecto denominado extravasación (45). En el ratón, los monocitos circulantes se diferencian en dos subtipos según sus niveles de expresión del marcador de superficie celular Ly6C (Ly6C<sup>alto</sup> y Ly6C<sup>bajo</sup>). Los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> se movilizan desde la médula ósea hacia los tejidos por un mecanismo dependiente del receptor de CCL2 (CCR2), expresan gran variedad de mediadores inflamatorios y proteolíticos, responden a señales inflamatorias como CCR2 y se acumulan en los sitios de inflamación. Además, se cree que en ausencia de inflamación los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> se pueden diferenciar al subtipo Ly6C<sup>bajo</sup>. Por su parte, los monocitos Ly6C<sup>bajo</sup> son antiinflamatorios, controlan la vasculatura y se infiltran en los tejidos al inicio de la inflamación (46).

La mayoría de los monocitos atraídos a la zona de la lesión se transforman después en macrófagos o en células dendríticas por efecto del factor estimulador de colonias de macrófagos (47) y producen gran cantidad de citoquinas proinflamatorias que, por un lado,

atraen más leucocitos circulantes, y por otro, inducen el remodelado vascular por las CMLV. No todos los macrófagos presentes en la lesión tienen el mismo fenotipo y, por consiguiente, la misma funcionalidad. Los macrófagos derivados de monocitos se polarizan principalmente a dos tipos celulares: los macrófagos activados clásicamente o M1 (inflamatorios) y los macrófagos activados de forma alternativa o M2 (reparadores) (48, 49). Los macrófagos M1 se pueden polarizar *in vitro* mediante la estimulación con lipopolisacárido bacteriano (LPS) e interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Este tipo de células se caracterizan por la expresión de CD86 y la producción de NO y citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (50). Por su parte, los macrófagos M2 se polarizan con las citoquinas IL-4 e IL-13 y se caracterizan por la expresión del receptor de manosa (51). También se ha demostrado que las dos isoformas de la enzima arginasa, la arginasa I citoplasmática (ArgI) y la arginasa II mitocondrial (ArgII) son marcadores de macrófagos M2 y M1, respectivamente (49).

Varios grupos han descrito la presencia de macrófagos M1 y M2 en lesiones ateroscleróticas humanas (52, 53). Bouhrel y su grupo mostraron que la distribución de los macrófagos con fenotipo M2 no coincidía con la distribución de las células espumosas, indicando que no todos los macrófagos tienen la misma capacidad de fagocitar LDL modificadas y de diferenciarse a células espumosas (52). Las funciones de cada tipo de macrófago son diferentes. Los macrófagos M1 secretan citoquinas proinflamatorias (IL-7 e IL-8) y moléculas vasoactivas (NO y endotelinas), liberan especies reactivas de oxígeno y promueven la proliferación de CMLV, contribuyendo así a la cronificación de la inflamación en las placas. En cambio, los macrófagos M2 tienen un papel antiinflamatorio mediado por diversos factores como TGF- $\beta$  (inhibe el reclutamiento de células inflamatorias) e IL-10 (efecto inmunosupresor de linfocitos T) y además son capaces de eliminar los restos apoptóticos a través del denominado proceso de eferocitosis. Se ha demostrado, en un modelo murino de aterosclerosis, que los macrófagos de lesiones tempranas tienden a ser mayoritariamente de fenotipo M2, mientras que en las lesiones avanzadas predomina el fenotipo inflamatorio M1 (49). Esto indica que podría existir un cambio de fenotipo de los macrófagos en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Por un lado, los M2 podrían ser los encargados de atenuar las respuestas inflamatorias iniciales, pero su efecto podría ser superado por la acumulación de macrófagos M1 inflamatorios.

La célula dendrítica es otro tipo de célula fagocítica que puede migrar e infiltrarse diferenciada desde los tejidos linfáticos o puede derivar de los monocitos atraídos a la zona de la lesión. En las placas ateroscleróticas, estas células se encuentran mayoritariamente en

la capa íntima de la lesión y son las principales presentadoras de antígenos a los linfocitos T no diferenciados. Para ello, migran a los ganglios linfáticos secundarios donde presentan a los linfocitos los antígenos que han capturado y procesado previamente (54).

Los linfocitos son los encargados de producir la respuesta inmune adaptativa que, a diferencia de la respuesta innata llevada a cabo por los macrófagos y otros fagocitos, es capaz de reconocer específicamente millones de antígenos y producir una respuesta específica frente a ellos. Se ha observado que en lesiones maduras las respuestas inmunes mediadas por las células T y B son claves para aumentar la respuesta inflamatoria. De hecho, tanto los niveles elevados en sangre de auto-anticuerpos frente a LDL oxidadas como su presencia en las lesiones ateroscleróticas humanas y murinas, son un indicativo de la participación de la inmunidad adaptativa en el desarrollo de la aterosclerosis (55, 56).

Entre los diferentes tipos de linfocitos T con diferentes funciones en las placas ateroscleróticas destacan los cooperadores (Th), los reguladores (Treg) y los citotóxicos (57). En el grupo de los linfocitos T cooperadores diferenciamos los subtipos Th1, Th2 y Th17. Los linfocitos Th1 y Th2 son los más importantes en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas, capaces de inducir cambios fenotípicos y funcionales en otros leucocitos de la respuesta inmune. En general, las citoquinas de la respuesta Th1 dirigen la diferenciación de macrófagos a M1, mientras que las citoquinas liberadas por las células Th2 favorecen el fenotipo M2 (58, 59). Las células Th17 se han considerado patogénicas, aunque todavía no se conoce bien su modo de acción en la aterosclerosis. Por otro lado, la respuesta Treg es antiinflamatoria y reduce la inflamación vascular (60).

En cuanto a las citoquinas, éstas pueden causar disfunción endotelial en las fases iniciales de la aterosclerosis. Por ejemplo, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  alteran la distribución de los complejos caderina-catenina entre las células vasculares y endoteliales, lo que provoca la reestructuración de las uniones intracelulares y la pérdida de la función de barrera y facilita la trans migración de leucocitos. En un estado más avanzado, diversas citoquinas inflamatorias, como IL-1, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , participan en la desestabilización de la placa aterosclerótica mediante inducción de apoptosis, aumentando la degradación de la matriz extracelular y la actividad procoagulante del tejido o suprimiendo la actividad anticoagulante (61).

Entre las quimioquinas y sus receptores implicados en aterosclerosis destacan: los ligandos del receptor CXCR3, que son activos en las células T efectoras; CCL2 y CX3CL1 y sus respectivos receptores CCR2 y CX3CR1, que atraen monocitos; CCL5 y su receptor CCR5, involucrados en el reclutamiento de células T y monocitos (17). En esta tesis nos hemos

centrado en las quimioquinas CCL2 y CCL5, cuyos niveles elevados se han detectado en células del endotelio vascular, CMLV y macrófagos, tanto *in vitro* como en placas ateroscleróticas humanas (62, 63) y cuya inhibición es capaz de reducir las lesiones ateroscleróticas en modelos experimentales (64).

Por último, las moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina) favorecen la adherencia de monocitos y linfocitos T circulantes al endotelio inflamado (43). Diferentes estudios muestran un aumento de su expresión en lesiones ateroscleróticas humanas y de ratón (65). Se ha sugerido que el control del infiltrado celular mediante modulación de la expresión de moléculas de adhesión y sus inductores, las citoquinas, es una diana importante en la terapia de enfermedades inflamatorias, entre ellas la aterosclerosis.

#### **3.1.4. Hiperglucemia**

Numerosas evidencias demuestran el papel proaterogénico de la hiperglucemia. Por ejemplo, la glucosa elevada tiene un efecto directo en el endotelio arterial, donde promueve la adhesión de leucocitos a las células endoteliales en las etapas iniciales del proceso aterosclerótico. La hiperglucemia crónica también induce cambios epigenéticos (p. ej. metilación y acetilación) en el promotor de genes prooxidantes y proinflamatorios en las células endoteliales (66). Además, se activa la ruta del poliol, haciendo que la glucosa intracelular se convierta en sorbitol mediante la aldosa reductasa, y se ha demostrado que los efectos proateroscleróticos de esta enzima están asociados a cambios endoteliales. Por su parte, la interacción de los AGE con sus receptores presentes en las células endoteliales promueve la expresión de VCAM-1 (67). La hiperglucemia también induce cambios fenotípicos en las CMLV, que pasan de un estado quiescente y contráctil a uno proliferativo, con mayor capacidad migratoria y expresión de genes inflamatorios (68). Por último, las lesiones ateroscleróticas de pacientes diabéticos tienen mayor contenido en macrófagos que los no diabéticos, y estos niveles se correlacionan mejor con los niveles de hemoglobina glicosilada que con los de lípidos (69). Los macrófagos de estas lesiones se caracterizan por un incremento del estrés oxidativo y de la expresión de genes inflamatorios y una disminución en la polarización hacia el fenotipo antiinflamatorio M2 (70).

## 4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA INFLAMACIÓN RENAL Y VASCULAR

Numerosas investigaciones han identificado las vías intracelulares y factores de transcripción activados por hiperglucemia, AngII y citoquinas y que convergen en la activación de los mecanismos patológicos implicados en el inicio y progresión de las complicaciones diabéticas. Entre ellas destacan familias de quinasas (p. ej. PKC, fosfatidil inositol 3 quinasa, Janus quinasa (JAK) y quinasas activadas por mitógenos (MAPK)), la vía de señalización de las proteínas Smad, las proteínas G y los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (factor nuclear- $\kappa$ B) y STAT (Transductor de la Señal y Activador de la Transcripción), cuya hiperactivación se ha demostrado que acelera el daño renal y vascular en animales diabéticos (71). En esta tesis nos centraremos en las vías de señalización NF- $\kappa$ B y JAK/STAT.

### 4.1. La vía NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B es una familia de factores de transcripción pleiotrópicos que integran una complicada red de genes extracelulares y vías de señalización que regulan la transcripción de cientos de genes relacionados con inflamación, inmunidad, apoptosis, proliferación celular y diferenciación (72). Esta familia consta de 5 miembros (p50, p52, p65/RelA, c-Rel y RelB) que comparten un dominio N-terminal de homología Rel responsable de la unión al DNA y de la homo- y heterodimerización (73). Entre los numerosos estímulos que activan la vía NF- $\kappa$ B destacan varias citoquinas, factores de crecimiento, LPS, moléculas asociadas a patógenos y a daño, receptores *Toll-like* y *Nod-like*, el estrés metabólico (glucosa elevada, AGE, lipoproteínas proaterogénicas), diversos mediadores inmunes como las inmunoglobulinas e incluso la proteinuria (74).

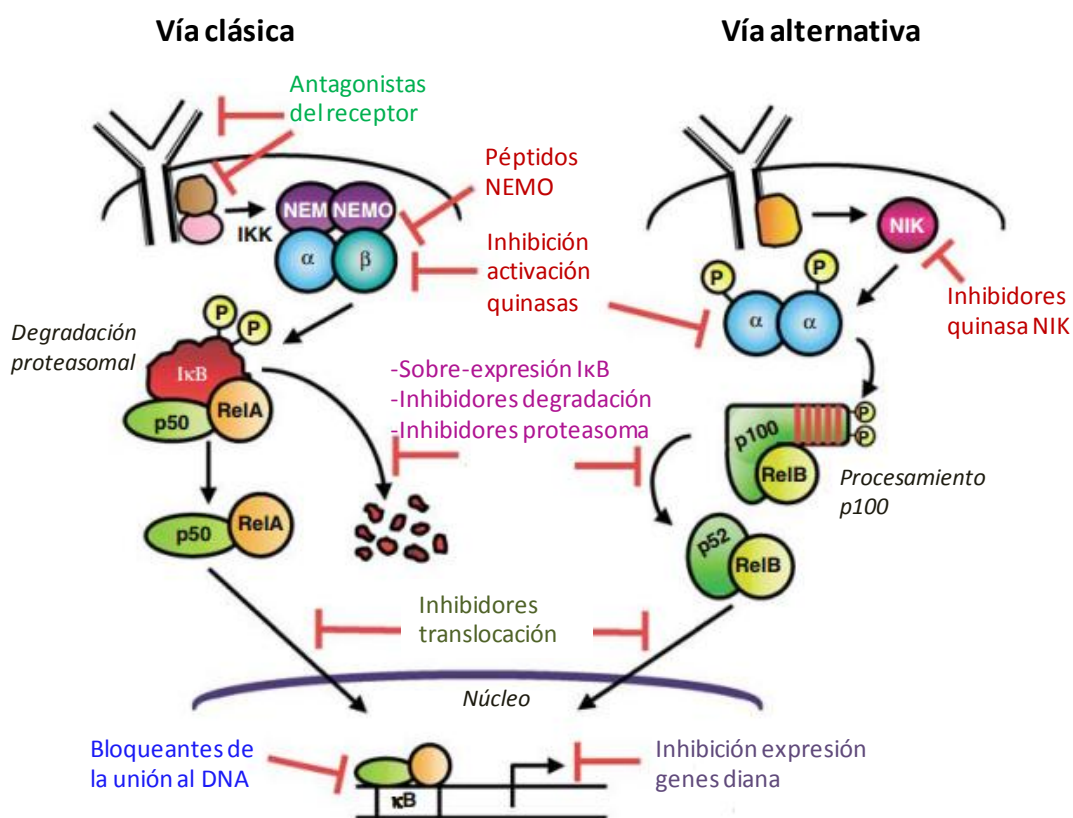
#### 4.1.1. Vías de activación de NF- $\kappa$ B

Existen dos vías de activación de NF- $\kappa$ B, cada una constituida por dímeros característicos con especificidad para prácticamente cada estímulo y tipo celular (75). En general, la vía clásica implica la activación de la I $\kappa$ B quinasa (IKK) y el dímero NF- $\kappa$ B formado por las proteínas p65 y p50, mientras que la vía alternativa está constituida por el dímero p52-RelB y la quinasa iniciadora NIK (quinasa inductora de NF- $\kappa$ B) (**figura 3**) (76).

En la ruta clásica, NF- $\kappa$ B está retenido en un estado inactivo por su unión a la proteína inhibidora I $\kappa$ B. Las proteínas I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , p100 y p105 con actividad I $\kappa$ B $\gamma$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ ) regulan la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y se caracterizan por repeticiones de anquirina en su extremo C-terminal que son esenciales para la interacción con los dominios Rel. Cuando la



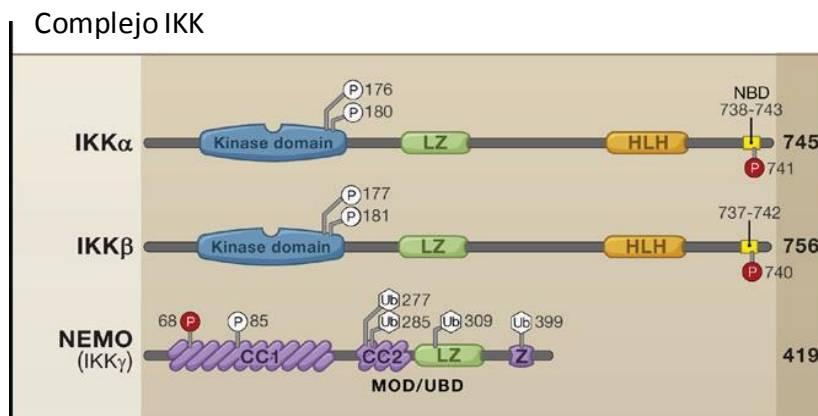
célula se estimula, I $\kappa$ B es fosforilada en dos residuos de serina por el complejo IKK, lo que induce su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma. La degradación de I $\kappa$ B libera el dímero activo de NF- $\kappa$ B y permite su translocación al núcleo, donde se une a los “elementos  $\kappa$ B” (GGGRNNYYCC, donde R es una purina, Y una pirimidina y N cualquier base) en los promotores de los genes diana (77), induciendo así la transcripción de factores proinflamatorios como citoquinas (p. ej. IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ ), quimioquinas (CCL2, CCL5, IL-8 y CXCL10), factores de crecimiento (PDGF y TGF- $\beta$ ), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y selectinas), enzimas (NO sintasa y ciclooxigenasa 2) y proteínas de fase aguda (ferritina y complemento C4), entre otras muchas (75, 78-80).



**Figura 3. Vías de activación de NF- $\kappa$ B y nivel de acción de varios inhibidores.** Modificado de Gilmore *et al.* 2006 (81).

El complejo IKK está formado por dos quinasas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) y la subunidad reguladora NEMO (modulador esencial de NF- $\kappa$ B) también conocida como IKK $\gamma$ . Las proteínas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  (85 y 87 kDa respectivamente) comparten un 52% de homología en su secuencia global, constituida por un dominio quinasa en el extremo N-terminal, un dominio central tipo ubiquitina y un dominio de dimerización/plegamiento  $\alpha$ -hélice seguido de un dominio de unión a NEMO denominado región NBD (del inglés *NEMO-binding domain*) (82). La

subunidad no catalítica NEMO es una proteína de 48 kDa que contiene un dominio de dedo de Zn en el extremo C-terminal, una cremallera de leucina y dominios de hélice superenrollados C- y N-terminal (**figura 4**).



**Figura 4. Miembros de la familia IKK.** Tomado de Hayden *et al.* 2008 (73).

La activación de IKK se produce mediante fosforilación de serinas localizadas en el bucle de activación del dominio quinasa (S177 y S181 en IKKβ, S176 y S180 en IKKα) por parte de miembros de la familia MAPK quinasa quinasa (p. ej. NIK, MEKK o NAK) o mediante autofosforilación tras la unión al propio receptor del ligando (p. ej. TNF-R1 y TRAF2) (72, 73, 83). IKKα e IKKβ interaccionan mediante el dominio de cremallera de leucina, necesario también para la actividad quinasa, y se unen al dímero NEMO a través de la región NBD, un hexapéptido localizado en los residuos L738-L743 del extremo C-terminal de IKKα (L737-L742 en IKKβ) (84). Para llevar a cabo esta unión necesita como mínimo 47-80 residuos localizados en el primer dominio hélice superenrollado. Estudios previos indican que IKKβ se une con más afinidad a NEMO que IKKα (82).

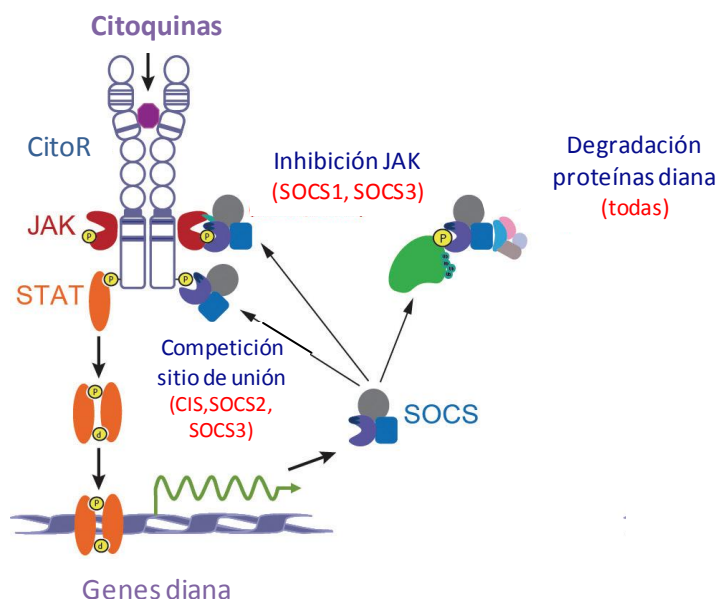
#### 4.1.2. Implicación de NF-κB en las complicaciones diabéticas

Numerosos estudios han descrito la activación de NF-κB en células sanguíneas, muestras de riñón y placas ateroscleróticas de pacientes diabéticos y modelos animales (85-87). Además, estudios *in vitro* demuestran que la glucosa elevada, los AGE, las lipoproteínas, la AngII y diversas citoquinas pueden activar la ruta de NF-κB, tanto en leucocitos como en células renales y vasculares. La actividad NF-κB regula la transcripción génica de quimioquinas, citoquinas y otros factores patogénicos involucrados en el desarrollo de la diabetes y sus complicaciones. Por ello, la modulación de la actividad inflamatoria de NF-κB se ha propuesto como un posible abordaje para inhibir la progresión de esta enfermedad (88).

Existe un gran número de compuestos capaces de inhibir la vía de NF- $\kappa$ B a varios niveles: 1) bloqueando la señal del estímulo en una fase temprana (p. ej. unión ligando-receptor); 2) inhibiendo un componente específico de la cascada de activación (p. ej. reclutamiento de un adaptador al receptor, activación del complejo IKK o degradación de I $\kappa$ B); 3) bloqueando la actividad nuclear de NF- $\kappa$ B (p. ej. translocación al núcleo, unión al DNA o transactivación de genes) (81). Algunos fármacos clásicos, como aspirina o estatinas, que presentan efectos beneficiosos en pacientes con diabetes y riesgo moderado o elevado de enfermedad cardiovascular, son también capaces de inhibir la vía NF- $\kappa$ B (2, 88). También se han descrito inhibidores de NF- $\kappa$ B de origen natural (p. ej. berberina, celastrol, querquetina y astragalosido IV) que mejoran la función renal, la inflamación y la fibrosis en la nefropatía diabética experimental, así como compuestos fitoquímicos (p. ej. resveratrol, ácidos gálico y boswélico, ebselen y parthenolide) con propiedades antiinflamatorias y ateroprotectoras en animales diabéticos (63, 81, 89). Algunos de estos compuestos están en fase clínica II/III en varias enfermedades inflamatorias, como bindarit, un fármaco inhibidor de la vía clásica de activación de NF- $\kappa$ B, efectivo en pacientes con nefritis lúpica y que se encuentra en fase clínica II en pacientes con nefropatía diabética (2). Sin embargo, la mayoría de la investigación renal y cardiovascular está todavía en fase experimental (2, 90).

#### **4.2. La vía JAK/STAT**

La vía JAK/STAT es un mecanismo intracelular esencial de citoquinas, pero también de moléculas proaterogénicas y factores activados por la diabetes, que regula la expresión de múltiples genes implicados en proliferación, diferenciación celular e inflamación (63, 91). La respuesta de las células a los estímulos externos de citoquinas implica la unión del ligando a su receptor transmembrana. Cuando esto ocurre, dos o más JAK asociadas al receptor se ponen en estrecha proximidad a través de la oligomerización del receptor, lo que promueve su autofosforilación y/o transfosforilación. Una vez activada, JAK fosforila residuos de tirosina en la región citoplasmática de los receptores para crear sitios de reconocimiento SH2 (dominio de homología Src-2) para miembros de la familia STAT. Una vez unidas al receptor por sus dominios SH2, las proteínas STAT son fosforiladas por JAK, lo que favorece su dimerización y posterior translocación al núcleo, donde inician la transcripción de los genes diana (**figura 5**) (92).



**Figura 5. Vía de señalización de JAK/STAT.** Activación a través de receptores de citoquinas y regulación negativa por las proteínas SOCS. Modificado de Trengove *et al.* (93).

La familia JAK está constituida por varias proteínas de 120-130 kDa (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2), caracterizadas por una región N-terminal de unión al receptor y dos dominios con actividad quinasa separados por una pequeña región bisagra (94). Por su parte, la familia STAT está formada por siete miembros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6) cuya estructura consta de un dominio N-terminal, un dominio espiral, un dominio de unión al DNA, un dominio SH2 y un dominio de transactivación en el extremo C-terminal. Este último dominio contiene uno o dos residuos aminoacídicos que son cruciales para la actividad de la proteína STAT, esto es, la fosforilación de un particular residuo de tirosina promueve la dimerización, mientras que la fosforilación de un particular residuo de serina aumenta la activación transcripcional (95).

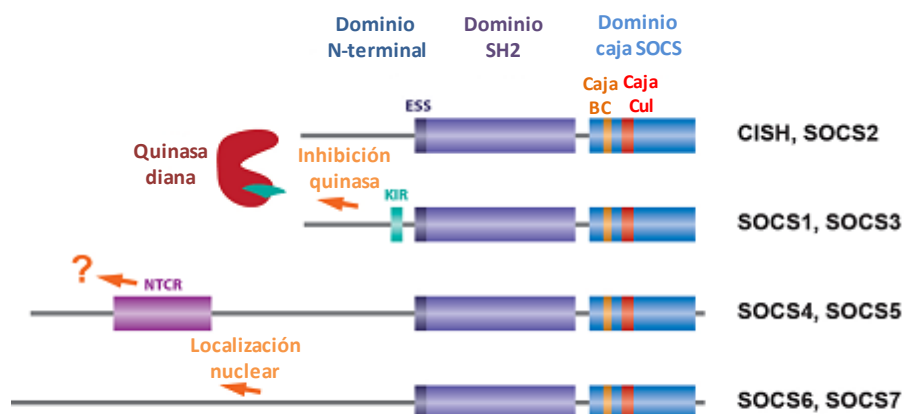
Las proteínas STAT se encuentran de forma latente en el citoplasma y su fosforilación promueve la formación de homodímeros (STAT1, STAT3, STAT4, STAT5A y STAT5B) o heterodímeros (STAT1-STAT2 y STAT1-STAT3) a través de su dominio SH2 y la tirosina fosforilada. Después, los dímeros activos se translocan rápidamente al núcleo, donde se unen a la secuencia GAS (secuencia activada gamma) del DNA, activando la expresión génica de quimioquinas (CCL2, CCL5, IL-8 y CXCL10), moléculas de adhesión (VCAM-1 e ICAM-1), proteínas de matriz (colágeno IV) y genes de respuesta temprana (c-fos y c-jun) (96, 97). A veces, los dímeros de STAT pueden interactuar con otros factores para formar complejos capaces de reconocer otros elementos de unión al DNA, como ISRE (elemento de respuesta estimulado por IFN) (94, 98). En general, STAT1 y STAT2 transducen señales de IFN ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ );

STAT3 es activado por IL-6, IL-10, el factor de crecimiento epidérmico y PDGF; STAT4, STAT5A y STAT5B transducen la señal del receptor de IL-12; mientras que STAT6 es importante para la señalización de IL-4 e IL-13 (99). Además de su clásica activación por los receptores de citoquinas con actividad tirosina quinasa, la vía JAK/STAT también puede activarse a través de otros receptores (p. ej. AngII, quimioquinas, lipoproteínas, glucosa, AGE, insulina o inmunoglobulinas) (100-102).

#### 4.2.1. Regulación de la vía JAK/STAT: proteínas SOCS

Se han descrito varios mecanismos reguladores que controlan la magnitud y la duración de la activación de JAK/STAT, entre ellos la internalización del receptor, la desfosforilación por tirosina fosfatasa y la inhibición directa por las proteínas inhibidoras de STAT o por las proteínas supresoras de la señal de citoquinas (SOCS) (92, 99).

Los reguladores de JAK/STAT más estudiados son las proteínas SOCS, una familia de pequeñas proteínas inducibles por citoquinas que inhibe la señal de transducción mediante bloqueo de la activación y fosforilación de JAK y STAT, creando un circuito de retroalimentación negativa (**figura 5**). Se han descrito 8 miembros (SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 y la proteína SH2 inducible por citoquinas (CIS)) que contienen un dominio N-terminal poco conservado, un dominio central SH2 y un dominio C-terminal más conservado llamado caja SOCS. Además, SOCS1 y SOCS3 presentan una región denominada KIR (región inhibidora de quinasa) implicada en la unión con JAK y en la inhibición de su actividad catalítica (**figura 6**). Las proteínas SOCS controlan la señalización del receptor mediante el reclutamiento de componentes de degradación proteasomal a sus proteínas diana, ya sean receptores específicos o moléculas asociadas. Esto lo logran mediante la unión de estas dianas a través de sus dominios SH2 y el reclutamiento de componentes del complejo de ubiquitinación E3 a través de su caja SOCS (93).



**Figura 6.**  
**Relación**  
**estructural de las**  
**proteínas SOCS.**  
Modificado de  
Trenkove *et al.*  
(93).

Experimentos en ratones manipulados genéticamente han demostrado el papel crucial de las moléculas SOCS en la fisiopatología. Por ejemplo, los ratones deficientes en SOCS1 mueren a las tres semanas de nacer debido a una inflamación sistémica por la respuesta incontrolada a IFN $\gamma$ . Los ratones deficientes en SOCS2, en cambio, desarrollan gigantismo por la respuesta exacerbada a las hormonas de crecimiento, mientras que los ratones sin SOCS3 mueren perinatalmente, probablemente por una formación placentaria defectuosa (103). Además de las vías de activación/inhibición bien conocidas para citoquinas, como los ejes IFN $\gamma$ /STAT1/SOCS1 e IL-6/STAT3/SOCS3, se han descrito otros estímulos que pueden activar la expresión de proteínas SOCS, entre ellos inmunocomplejos, LPS, quimioquinas, insulina, AngII, glucosa o factores de crecimiento (97, 102, 104-106), lo que demuestra el amplio rango de acción de este mecanismo inhibidor. Por otro lado, pueden existir inhibiciones cruzadas entre los diferentes miembros de la familia SOCS. En este sentido, se ha descrito la capacidad de algunas citoquinas de inhibir, a través de la inducción de proteínas SOCS, las acciones de otras citoquinas. Es el caso de la acción de IL-10 sobre señales de IFN $\gamma$  (mediada por SOCS3) o de IFN $\gamma$  sobre IL-4 (vía SOCS1), en ambos casos a través de la inhibición de STAT1 (107, 108).

#### **4.2.2. Implicación de la vía JAK/STAT en el daño renal y vascular**

Estudios genéticos por *microarrays* en biopsias renales de pacientes diabéticos han identificado componentes de la vía JAK/STAT que están aumentados en los glomérulos durante la fase temprana de la enfermedad y en las áreas tubulares en estadios más avanzados (109). En modelos experimentales y experimentos *in vitro* se ha demostrado que la activación de JAK1, JAK2, STAT1 y STAT3 por la diabetes participa en la glomeruloesclerosis y la fibrosis intersticial (100, 109, 110). Además, fármacos clásicos como los inhibidores del sistema renina-angiotensina o las estatinas previenen la activación de esta vía en animales diabéticos (109, 111). Diversos inhibidores específicos de JAK1/JAK2 (p. ej. baricitinib), JAK2 (AG-490), JAK3 (Janex-1) y STAT1 (fludarabina) también se han propuesto como posibles agentes antidiabéticos por su efecto renoprotector (2).

La vía JAK/STAT también regula procesos clave durante la aterosclerosis, como el reclutamiento leucocitario, la migración y proliferación de CMLV, la formación de células espumosas y la apoptosis. Se han encontrado isoformas de JAK y STAT en las regiones inflamatorias de placas ateroscleróticas humanas y en modelos experimentales de enfermedades cardiovasculares (112-114). En ratones, la deficiencia (total o específica de célula) en los genes de STAT1 y STAT3 previene el desarrollo de placas ateroscleróticas,

mientras que la inhibición farmacológica de JAK2, STAT1 y STAT3 reduce el tamaño de la lesión y la hiperplasia neointimal (115).

Varios estudios han demostrado que la inflamación aguda o crónica altera la expresión de proteínas de la familia SOCS (97). Particularmente, SOCS1 y SOCS3 se han relacionado con una variedad de factores proinflamatorios y proaterogénicos, y su expresión se ha demostrado en placas de ateroma humanas (91) y en muestras renales de pacientes y animales diabéticos (116), actuando como un mecanismo compensatorio, pero no suficiente, para suprimir el daño en los tejidos. De hecho, diversas estrategias basadas en el papel regulador de las proteínas SOCS para disminuir la actividad patológica de JAK/STAT han resultado ser efectivas en diversos modelos experimentales de inflamación aguda y crónica (93, 117), así como en diabetes (116, 118, 119) y aterosclerosis (91, 120, 121).

## **II.OBJETIVOS**





La prevalencia de la diabetes mellitus está alcanzando proporciones epidémicas. Los tratamientos actuales consiguen frenar la evolución de la enfermedad pero no evitan la aparición de eventos cardiovasculares y la progresión de los pacientes a insuficiencia renal terminal. Puesto que la inflamación crónica juega un papel importante en el desarrollo de la diabetes y sus complicaciones, nuestra **hipótesis** propone la identificación de nuevas dianas terapéuticas para prevenir el daño renal y vascular inducido por las condiciones de hiperglucemia y mediado por citoquinas y otros factores inflamatorios. El **objetivo global** de esta tesis es el desarrollo preclínico de nuevos abordajes terapéuticos basados en la modulación de dos vías intracelulares activadas en el entorno diabético, que regulan la expresión de numerosas proteínas inflamatorias y cuya activación está implicada en la progresión de las complicaciones de la diabetes: el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y la vía Janus quinasa/Transductor de la señal y activador de la transcripción (JAK/STAT).

**Objetivo 1. Modulación específica de la actividad inflamatoria de NF- $\kappa$ B en un modelo experimental de nefropatía y aterosclerosis asociadas a diabetes.**

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es uno de los principales reguladores de las respuestas inflamatorias durante las complicaciones de la diabetes y su activación se ha descrito tanto en pacientes como en modelos experimentales. Considerando que NF- $\kappa$ B es una buena diana para la terapia antiinflamatoria en las complicaciones diabéticas (nefropatía y aterosclerosis), diseñamos un péptido sintético constituido por una secuencia de permeabilidad celular unida a la región NBD esencial para la formación del complejo de quinasa IKK en la vía de activación de NF- $\kappa$ B.

**1.1.** Caracterizar *in vitro* las propiedades antiinflamatorias del péptido inhibidor de NF- $\kappa$ B en cultivos de células renales y vasculares bajo condiciones de hiperglucemia e inflamación.

**1.2.** Explorar *in vivo* el efecto renoprotector y antiaterosclerótico del tratamiento con el péptido inhibidor de NF- $\kappa$ B en un modelo experimental de diabetes tipo 1 en ratones hipercolesterolémicos.

**1.3.** Evaluar la influencia del tratamiento con el péptido en la inflamación local y sistémica de los ratones diabéticos.

**Objetivo 2. Inhibición constitutiva de la vía JAK/STAT en la aterosclerosis experimental mediante terapia génica con SOCS3.**

La activación crónica de la vía JAK/STAT contribuye a la inflamación vascular durante la aterosclerosis a través de la inducción de genes clave en el reclutamiento de leucocitos, en la proliferación y diferenciación celular y en la formación de células espumosas. Basados en la familia de proteínas supresoras de la señal de citoquinas (SOCS), los principales reguladores endógenos de la vía JAK/STAT, desarrollamos un vector de expresión del gen SOCS3 para su aplicación en terapia génica experimental.

**2.1.** Investigar las propiedades antiinflamatorias y ateroprotectoras de la terapia génica con un adenovirus que codifica la proteína SOCS3 en un modelo murino de aterosclerosis.

**2.2.** Analizar *in vitro* el efecto de la transfección génica de SOCS3 en las repuestas de células vasculares y monocitos mediadas por la vía JAK/STAT.

# **III.MATERIAL Y MÉTODOS**

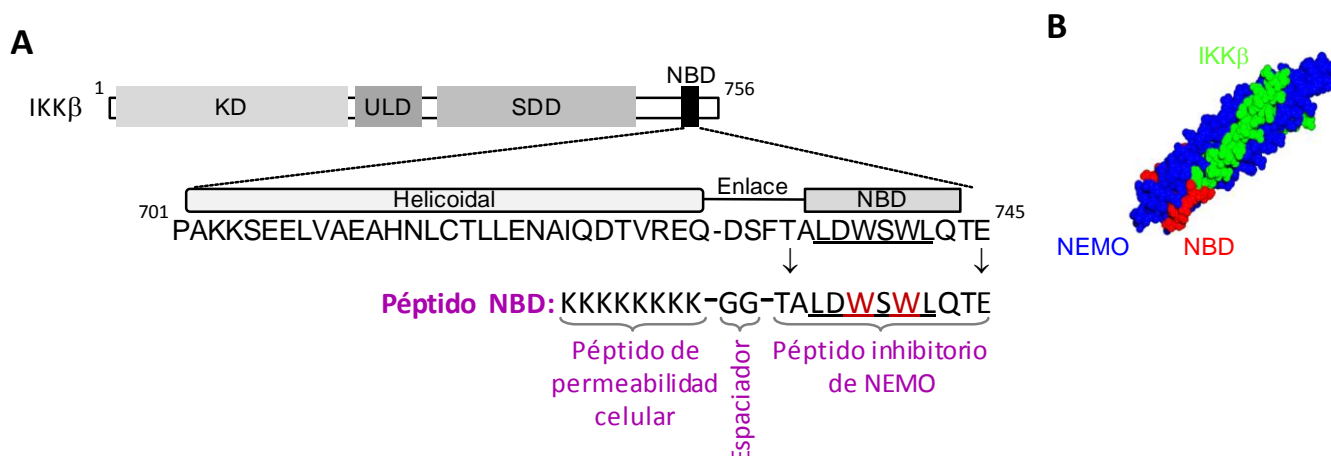


## 1. ESTÍMULOS

Los estímulos celulares empleados en esta tesis fueron lipopolisacárido bacteriano (LPS, 1 µg/mL) y D-(+)-glucosa (30 mM) de Sigma, y las citoquinas recombinantes murinas IFN $\gamma$  (10<sup>3</sup> U/mL) e IL-6 (10<sup>2</sup> U/mL) de Peprotech.

## 2. DISEÑO DEL PÉPTIDO NBD

Se diseñó un péptido de 21 aminoácidos derivado de la región NBD de IKK $\beta$  (TALDWSWLQTE) con capacidad de inhibir selectivamente la activación de NF- $\kappa$ B por bloqueo de la interacción entre las subunidades  $\gamma$  y  $\alpha/\beta$  del complejo de quinasas IKK. La secuencia inhibidora se acopló a un péptido catiónico de permeabilización celular (8K). Como control estructural se utilizó un péptido mutado (Mut) con dos sustituciones (W  $\rightarrow$  A) en la secuencia (**figura 7**). Ambos péptidos se sintetizaron mediante el método Fmoc en fase sólida, se purificaron por HPLC y se analizaron por espectrofotometría de masas (Proteogenix). Los péptidos liofilizados se disolvieron en 2% acetonitrilo y después en solución salina hasta la concentración de 1 M, se esterilizaron por filtración y se conservaron a -80°C bajo atmosfera de N<sub>2</sub>.



**Figura 7. (A)** Estructura de la proteína IKK $\beta$ : KD, dominio quinasa; ULD, dominio central tipo ubiquitina; SDD, dominio de dimerización/plegamiento  $\alpha$ -hélice; NBD, dominio de unión a NEMO. Se indica la secuencia completa (residuos 701-745) del dominio NBD, subrayando los residuos esenciales para el ensamblaje/estabilización del complejo IKK $\alpha/\beta$ -NEMO. Abajo se indica la secuencia del péptido sintético NBD utilizado en este estudio, conteniendo la región inhibidora y la de permeabilización celular. Los residuos en rojo corresponden a las modificaciones (W  $\rightarrow$  A) del péptido mutante. **(B)** Estructura tridimensional del complejo IKK, con la región NBD resaltada en rojo.

### **3. PURIFICACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES**

#### **3.1. Purificación de adenovirus**

El adenovirus de primera generación regulado por el promotor del citomegalovirus y que contiene el gen SOCS3 de ratón (Ad-S3) se preparó con el sistema de vector AdEasy™ (Qbiogene). Brevemente, el cDNA de SOCS3 de ratón se escindió del vector p513HA (con NdeI y BamHI) y se insertó en el vector de transferencia pShuttle-CMV. El plásmido resultante se linearizó con PmeI y se cotransformó en bacterias junto con pAdEasy-1 (deleción de E1 y E3). La construcción del adenovirus recombinante se unió con PacI y se transfectó a las células empaquetadoras HEK 293 (riñón embrionario humano) para producir partículas virales. Así, estas células se convirtieron en productoras del virus portador del gen de interés. Una vez aparecieron síntomas de citotoxicidad vírica, las células se recogieron y lisaron mediante ciclos de congelación/descongelación para la posterior extracción del adenovirus. Para ello, empleamos un kit comercial (AdEasy™ Virus Purification Kit; Cultek) el cual se fundamenta en una membrana que adsorbe selectivamente los virus del serotipo Ad5. Una vez retenidos en la membrana y tras varios lavados para descartar uniones no específicas, se obtuvieron los virus con tampón de elución. El adenovirus vacío (Ad-vacío) y el adenovirus que expresa la proteína verde fluorescente (Ad-GFP) se utilizaron como vectores de control.

#### **3.2. Titulación vírica**

Para la titulación de adenovirus utilizamos el kit Adeno-X™ Rapid Titer kit (BD Biosciences-Clontech), el cual permite titular únicamente los viriones (partículas virales completas que son infectivas). Se sembraron células HEK 293 en placas de 24 pocillos y se realizaron infecciones con diluciones seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ ) de los adenovirus recombinantes (Ad-S3 o Ad-vacío). Tras 48 horas de infección con el virus, las células se fijaron durante 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  en metanol frío, se lavaron y se incubaron durante 90 minutos con un anticuerpo frente a la cápside vírica (Anti-Hexon, diluido 1/1000 en PBS-1% albúmina de suero bovino (BSA)). Seguidamente, se incubaron las células con IgG de rata conjugada con peroxidasa (HRP) en PBS-1% BSA. La detección del anticuerpo se determinó utilizando DAB (tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina; Dako) como cromógeno. Para determinar la concentración de los virus infectivos contamos las células en el microscopio y aplicamos la siguiente fórmula para calcular la cantidad de unidades formadoras de placa (pfu) por mL:

$$\text{pfu/mL} = \frac{(\text{Células positivas/nº campos}) \times (\text{nº campos totales en pocillo})}{\text{Volumen de virus con el que infectamos} \times \text{Factor de dilución}}$$

## 4. CULTIVOS CELULARES

### 4.1. Cultivos primarios

Los cultivos primarios de células mesangiales (CM) se obtuvieron a partir de riñones de ratones macho de fenotipo salvaje (C57BL/6) de 12 semanas de edad. Los riñones extraídos fueron decapsulados y la corteza renal fue cortada en trozos pequeños que se pasaron secuencialmente por dos tamices de 150 y 50  $\mu\text{m}$  de poro. El homogeneizado resultante se incubó con 500 U/mL de colagenasa tipo IA (125 U/mg; Sigma) durante 25 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se detuvo la reacción añadiendo medio de cultivo RPMI 1640 tamponado con 25 mM HEPES pH 7.4 (RPMI-HEPES, Gibco Invitrogen), suplementado con 100 U/mL penicilina, 100  $\mu\text{g/mL}$  estreptomicina, 2 mM glutamina y 10% suero fetal bovino (SFB) previamente deplementado (30 minutos a 56°C). Después de centrifugar durante 5 minutos a 1200 rpm, el precipitado obtenido se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en placas de 100 mm. Las células permanecieron en incubación a 37°C en una estufa humidificada y con atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Las CM aparecen a los 7-14 días después de la siembra y, por las condiciones del cultivo, los demás tipos celulares (mayoritariamente las células epiteliales), van muriendo. Las CM se utilizaron para los experimentos a los 20-24 días de cultivo.

Los cultivos primarios de CMLV se obtuvieron a partir de aortas de ratones de fenotipo salvaje de 12-16 semanas de edad. Se extrajeron las aortas y se eliminó la grasa y el tejido conectivo adherido. Los vasos se trocearon en piezas de 1 mm y se incubaron durante 45 minutos a 37°C con 4 mg/mL de colagenasa tipo II (290 U/mg; Sigma) resuspendida en medio DMEM (Lonza) suplementado con 100 U/mL penicilina, 100  $\mu\text{g/mL}$  estreptomicina y 2 mM glutamina. Tras varios lavados, las células se resuspendieron en DMEM con 10% SFB, se sembraron en frascos de cultivo de 25  $\text{mm}^2$  y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ . El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días y se utilizaron entre el tercer y el séptimo pase.

Los macrófagos peritoneales de ratones de fenotipo salvaje se obtuvieron mediante lavado de la cavidad peritoneal con solución salina fría y se sembraron ( $1 \times 10^7$  cél/pocillo) en placas de 6 pocillos (Corning). Después de 2 horas de incubación y sucesivos lavados, se procesaron las células adheridas.



## **4.2. Líneas celulares**

Las células epiteliales de túbulo renal proximal (línea celular murina MCT; proporcionadas por el Dr. Eric Neilson, Universidad de Vanderbilt, EEUU), se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% SFB de complementado, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 2 mM glutamina y se utilizaron a 60-70% de confluencia.

La línea celular de macrófagos murinos (RAW 264.7, TIB-71; American Type Culture Collection) se mantuvo en medio DMEM con 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 2 mM glutamina y 10% SFB.

Las células empaquetadoras HEK 293 fueron proporcionadas por el profesor A. J. Rees (Universidad de Aberdeen, Reino Unido) y se crecieron en medio DMEM con 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 2 mM glutamina y 10% SFB.

## **4.3. Ensayos de viabilidad y proliferación celular**

La viabilidad celular en las condiciones experimentales estudiadas se analizó mediante ensayo de MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-3,5-difenilformazan; Sigma). Las células en placas de 96 pocillos se estimularon por triplicado y se tiñeron con 0.1 mg/mL MTT. La absorbancia del MTT metabolizado se midió a  $\lambda=600\text{nm}$  en un lector de placas.

La proliferación se determinó en placas de 96 pocillos mediante el método colorimétrico del azul de metileno. Las células se fijaron en 10% formaldehído en PBS, se tiñeron con 1% azul de metileno y se lavaron con tampón borato 0.01M. Una vez seca la placa, se eluyó el colorante con 100 µL de etanol en HCl 0.1M (1:1) y se leyó la absorbancia a  $\lambda=620\text{nm}$ .

## **5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

### **5.1. Extracción de proteínas totales y nucleares**

Tras realizar los experimentos, las células se despegaron de la placas de cultivo, se lavaron con salino frío y se homogeneizaron con tampón de lisis frío (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40, 0.2 mM PMSF, 0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y 10 µL/mL cóctel de inhibidores de proteasas).

Para la obtención de proteínas nucleares, las células se resuspendieron en 400 µL de tampón frío (10 mM HEPES pH 7.8, 15 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 1 mM PMSF) y se homogeneizaron. Tras una centrifugación durante 10 minutos a 12000 rpm para separar la fracción citosólica de la nuclear, el precipitado se resuspendió en el mismo tampón y se

incubó durante 45 minutos a 4°C con KCl a una concentración final de 0.39 M, originando así la ruptura de la membrana nuclear. A continuación, los núcleos se centrifugaron a 12000 rpm durante 1 hora y los sobrenadantes fueron dializados frente a 50 mM HEPES pH 7.8, 50 mM KCl, 10% glicerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT y 1 mM PMSF.

En otros experimentos, las células se mantuvieron durante 15 minutos a 4°C en 400 µL de tampón de inmunoprecipitación frío (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 mM NaF, 0.2 mM PMSF y 10 µL/mL cóctel de inhibidores de proteasas), se homogeneizaron y se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C para recoger el sobrenadante.

La concentración de proteínas en los diferentes extractos proteicos se cuantificó mediante el método del BCA (ácido bicinónico, Pierce).

## 5.2. Inmunoprecipitación y Western blot

Para los ensayos de inmunoprecipitación, se mezclaron 250 µg de lisado con 2 µg de anticuerpo anti-NEMO y tampón de inmunoprecipitación hasta completar 500 µL y se incubaron a 4°C durante toda la noche en rotación. Después se añadieron 20 µL de Proteína A/G PLUS-Agarosa (Santa Cruz) durante 2 horas a 4°C. Tras 4 lavados (12000 rpm durante 4 minutos a 4°C) con tampón de inmunoprecipitación, las proteínas precipitadas se resuspendieron en 40 µL de tampón de carga de electroforesis (250 mM Tris pH 6.8, 6% glicerol, 2% SDS, 0.003% azul de bromofenol y 1% β-mercaptoetanol).

Las proteínas (30 µg totales, 25 µg nucleares o procedentes de inmunoprecipitación) se desnaturalizaron (5 minutos a 95°C), se separaron por electroforesis en geles de PAGE-SDS y se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno; Immobilon, Millipore). Para evitar uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón TBSt (1 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl y 0.1% Tween-20) conteniendo 4% de leche desnatada. A continuación se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios (**tabla 1**) durante toda la noche a 4°C. Tras sucesivos lavados en TBSt, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo se realizaron varios lavados para retirar el exceso de anticuerpo no unido. Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia ECL (Amersham) y se densitometraron con el software ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Bio-sciences). Los anticuerpos anti-α-tubulina y anti-histona H3 (**tabla 1**) se emplearon como control de carga de proteínas totales y nucleares, respectivamente.

| Anticuerpo primario                   |                |          | Anticuerpo secundario  |          |
|---------------------------------------|----------------|----------|------------------------|----------|
| Antígeno                              | Casa comercial | Dilución | Antígeno (huésped)     | Dilución |
| p65                                   | Santa Cruz     | 1/500    | IgG conejo HRP (burro) | 1/2000   |
| IKK $\alpha$ / $\beta$                | Santa Cruz     | 1/500    | IgG conejo HRP (burro) | 1/2000   |
| P-IKK $\alpha$ / $\beta$ (Ser176/180) | Cell Signaling | 1/200    | IgG conejo HRP (burro) | 1/2000   |
| NEMO (IKK $\gamma$ )                  | BD Pharmingen  | 1/500    | IgG ratón HRP (oveja)  | 1/2000   |
| Histona H3                            | Cell Signaling | 1/2000   | IgG conejo HRP (burro) | 1/2000   |
| P-STAT1 (Tyr701)                      | Invitrogen     | 1/500    | IgG ratón HRP (oveja)  | 1/2000   |
| P-STAT3 (Ser727)                      | Cell Signaling | 1/500    | IgG conejo HRP (burro) | 1/2000   |
| SOCS1                                 | Invitrogen     | 1/200    | IgG conejo HRP (burro) | 1/2000   |
| SOCS3                                 | Santa Cruz     | 1/200    | IgG conejo HRP (burro) | 1/2000   |
| $\alpha$ -tubulina                    | Sigma          | 1/5000   | IgG ratón HRP (oveja)  | 1/2000   |

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados para Western blot.** Los anticuerpos secundarios fueron suministrados por GeHealthcare (Little Chalfont).

### 5.3. Inmunofluorescencia en células

Las células se crecieron en portaobjetos con 4 cámaras tratados para el crecimiento celular (LabTek). Una vez finalizado el experimento, las células se lavaron, se fijaron con 4% paraformaldehído durante 10 minutos y se permeabilizaron con 0.5% Triton X-100 durante 10 minutos. Después de bloquear las uniones inespecíficas con PBS conteniendo 4% BSA y 6% de suero, las células se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios (**tabla 2**). A continuación se lavaron e incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 hora, se lavaron y los núcleos se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Por último, las muestras se montaron con FluorSave (Calbiochem) y la fluorescencia se detectó mediante microscopia convencional (Eclipse 4000 con software ACT-1; Nikon) o confocal (Confocal System TCS SP5; Leica).

| Anticuerpo primario  |          | Suero                | Anticuerpo secundario   |                 |          |
|----------------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------------|----------|
| Antígeno             | Dilución |                      | Antígeno                | Marcaje         | Dilución |
| p65 <sup>1</sup>     | 1/75     | caballo <sup>2</sup> | IgG conejo <sup>3</sup> | Alexa Fluor 488 | 1/200    |
| SOCS3 <sup>1</sup>   | 1/100    | conejo <sup>2</sup>  | IgG conejo <sup>3</sup> | FITC            | 1/200    |
| P-STAT1 <sup>1</sup> | 1/75     | caballo <sup>2</sup> | IgG ratón <sup>3</sup>  | Alexa Fluor 488 | 1/200    |

**Tabla 2. Condiciones empleadas para la inmunofluorescencia en células.** Los anticuerpos y sueros fueron administrados por: <sup>1</sup>Santa Cruz, <sup>2</sup>Chemicon, <sup>3</sup>Invitrogen.

## 5.4. Ensayo de gen reportero

Empleamos dos vectores con sitios de unión para STAT1 (pGAS-Luc) y STAT3 (pSTAT3-Luc) insertados en el gen reportero de luciferasa de *Photinus pyralis* (pTA-Luc) y el vector control luciferasa de *Renilla* (pRL-TK) en relación 10:1. Las células sembradas en placas de 12 pocillos se cotransfectaron con los vectores reporteros empleando FuGENE (Roche) como reactivo de transfección (proporción 3:1) en presencia de adenovirus recombinantes (Ad-S3 o Ad-vacío; multiplicidad de infección=40). Después de 24 horas, las células se estimularon con citoquinas durante 16 horas y se lisaron en 100  $\mu$ L de tampón de lisis (Dual Luciferase Assay System, Promega). La actividad luciferasa se midió en un luminómetro y los valores se normalizaron teniendo en cuenta la concentración de proteínas (método BCA) y la eficiencia de la transfección (actividad *Renilla*).

## 5.5. ELISA

La concentración de la quimioquina CCL2 se determinó en sobrenadantes celulares y sueros de ratones mediante ELISA (BD Biosciences) empleando una curva estándar de CCL2 recombinante murino y el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) para la detección colorimétrica. La absorbancia se midió en un lector de placas de ELISA ( $\lambda$ =450 nm y corrección a 570 nm), expresando los valores en ng/mL.

La actividad de unión al DNA de NF- $\kappa$ B en los extractos nucleares se determinó empleando el ensayo TransAM NF- $\kappa$ B p65 (Active Motif). Las proteínas nucleares se añadieron a una placa de 96 pocillos recubiertos con el oligonucleótido consenso de NF- $\kappa$ B (5'-GGGACTTCC-3'). Los complejos unidos específicamente se incubaron con un anticuerpo que reconoce la subunidad p65, seguido del anticuerpo secundario conjugado con HRP y su posterior detección colorimétrica.

## 6. ANÁLISIS DE RNA

### 6.1. Extracción de RNA

El RNA total procedente de tejidos de ratón (riñón, aorta y bazo) y de cultivos celulares se extrajo con el reactivo Trizol (Sigma). La cuantificación del RNA se realizó por medida de absorbancia a 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40  $\mu$ g/mL de RNA. Finalmente se comprobó que la relación entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm era cercana a 2, indicativo de ausencia de contaminación proteica.

## 6.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Para obtener cDNA realizamos una reacción de transcripción inversa a partir de 1.5 µg de RNA usando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) en un termociclador convencional (PTC-100, MJ Research Inc) con las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C.

La PCR a tiempo real se llevó a cabo mediante el sistema de detección secuencial Taqman ABI 7700 usando una TaqDNA polimerasa activada por calor (Amplitaq Gold) y cebadores comerciales (disponibles en la base de datos de Applied Biosystems) o diseñados por nosotros (**tabla 3**). Después de un paso inicial de 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Los resultados de la amplificación del gen interés se normalizaron con los datos obtenidos del control interno (18S) que se amplificó en paralelo. Todas las medidas se hicieron por duplicado y se analizaron usando el programa informático 7500 System SDS Software V1.2b1c3 (Applied Biosystems).

| Gen                       | Código del cebador               | Gen                       | Código del cebador               |
|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| <i>18S</i> <sup>1</sup>   | 4310893E                         | <i>Socs1</i> <sup>2</sup> | Mm00782550_s1                    |
| <i>Ccl2</i> <sup>2</sup>  | Mm00441242_m1                    | <i>Socs3</i> <sup>2</sup> | Mm00545913_s1                    |
| <i>Ccr2</i> <sup>2</sup>  | Mm00438270_m1                    | <i>Icam1</i> <sup>2</sup> | Mm00516023_m1                    |
| <i>Ccl</i> <sup>2</sup>   | Mm01302428_m1                    | <i>Tnfα</i> <sup>2</sup>  | Mm00443258_m1                    |
| <i>Ccr5</i> <sup>2</sup>  | Mm01963251_s1                    | <i>Ifnγ</i> <sup>2</sup>  | Mm01168134_m1                    |
| <i>Tnfα</i> <sup>2</sup>  | Mm00443258_m1                    | <i>Il4</i> <sup>2</sup>   | Mm00445259_m1                    |
| <i>Kim-1</i> <sup>2</sup> | Mm00506686_m1                    | <i>Foxp3</i> <sup>2</sup> | Mm00475162_m1                    |
| <i>Fn</i> <sup>2</sup>    | Mm 01256734_m1                   | <i>Il-17</i> <sup>2</sup> | Mm00439618_m1                    |
| <i>Col1</i> <sup>2</sup>  | Mm00801574_m1                    | <i>Cd204</i> <sup>2</sup> | Mm00446214_m1                    |
| <i>Tgfβ</i> <sup>2</sup>  | Mm01178820_m1                    | <i>Cd36</i> <sup>2</sup>  | Mm01135198_m1                    |
|                           |                                  |                           |                                  |
|                           | <b>Secuencia cebador directo</b> |                           | <b>Secuencia cebador inverso</b> |
| <i>Argl</i> <sup>3</sup>  | TTAGGGTTACGGCCGGTGGAGAGGA        |                           | TGCTGCATGTGCTCGGGCTGT            |
| <i>Argll</i> <sup>3</sup> | TTGGCCTGAGAGATGTGGAGCCTCC        |                           | ACTCAGGTGGATTGGCCTCTGCC          |
| <i>18S</i> <sup>3</sup>   | CCGTCGTAGTCCGACCATAA             |                           | CAGCTTTGCAACCACTATCCC            |

**Tabla 3.** Cebadores murinos empleados en la PCR a tiempo real (<sup>1</sup>VIC, <sup>2</sup>FAM o <sup>3</sup>Sybr Green).

## 7. MODELOS EXPERIMENTALES

### 7.1. Animales empleados

En los modelos experimentales estudiados en esta tesis se emplearon ratones macho *knock-out* para el gen de la apolipoproteína E ( $\text{apoE}^{-/-}$ , cepa C57BL6; Jackson Laboratory). Todos los procedimientos con los animales se realizaron conforme a la normativa europea y nacional vigente (Directiva 2010/63/EU, Recomendación 2007/526/EC y Real Decreto 53/2013) y fueron previamente aprobados por el comité ético de nuestra institución.

### 7.2. Modelo experimental de nefropatía y aterosclerosis aceleradas por diabetes

Para inducir la diabetes tipo I empleamos estreptozotocina (STZ), una toxina producida por bacterias *Streptomyces*, altamente tóxica para las células  $\beta$ -pancreáticas. Los ratones  $\text{apoE}^{-/-}$  (machos, 10 semanas de edad) recibieron dos inyecciones intraperitoneales en días consecutivos de STZ (125 mg/kg/día, diluida en tampón citrato 10 mM pH 4.5; Sigma). Los animales diabéticos (glucemia  $>350$  mg/dL) se dividieron en tres grupos: 1) Tratados con el vehículo del péptido (0.1% acetonitrilo en 200  $\mu$ L de solución salina) (n=9); 2) Tratados con la dosis baja del péptido NBD (0.7  $\mu$ mol/kg/día, n=7); 3) Tratados con la dosis alta del péptido NBD (4  $\mu$ mol/kg/día, n=9). La administración se realizó por vía intraperitoneal 3 veces por semana durante 10 semanas. Como controles no diabéticos, se emplearon ratones  $\text{apoE}^{-/-}$  normoglucémicos de la misma edad tratados con vehículo (n=4) o péptido NBD (4  $\mu$ mol/kg/día, n=4) (**figura 8**). Los ratones se mantuvieron con acceso libre a agua y comida (dieta estándar), realizando controles de peso y glucemia cada 2-3 días. Los animales con glucemia  $\geq 520$  mg/dL recibieron una inyección subcutánea de 0.4 U de insulina para prevenir su muerte. Al finalizar el modelo, los animales fueron sacrificados y se recogieron las muestras para su posterior estudio.

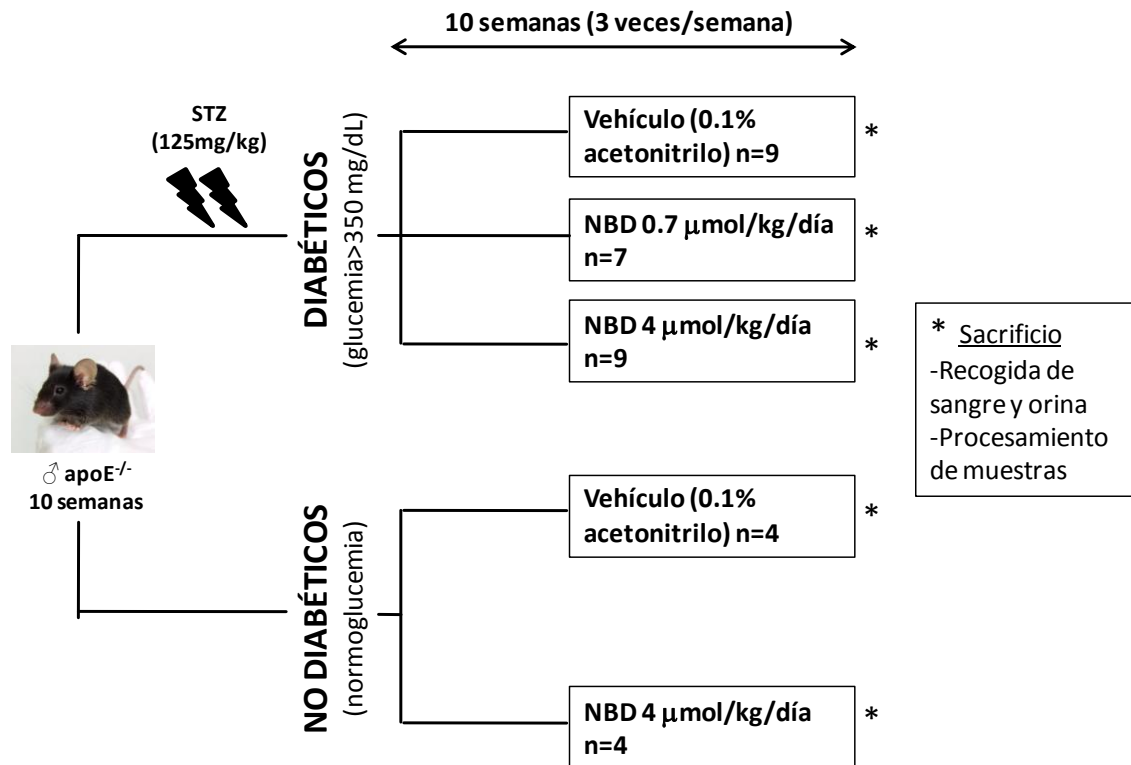


Figura 8. Esquema del protocolo experimental de nefropatía y aterosclerosis en ratones diabéticos.

### 7.3. Modelo experimental de aterosclerosis

Con el fin de analizar el efecto de la terapia génica con SOCS3, ratones macho apoE<sup>-/-</sup> de 8 semanas (modelo de lesión temprana) o 28 semanas (modelo de lesión avanzada) recibieron una inyección intravenosa (a través de la vena de la cola) de adenovirus recombinantes ( $1-2 \times 10^{10}$  pfu en 250 µL) y después se alimentaron con dieta grasa tipo Western (21% grasa y 0.15% colesterol; Harlan Labs) durante 5 semanas. Grupos de estudio: 1) Modelo de lesión temprana: controles no tratados (n=15), Ad-vacío (n=14), Ad-S3 (n=16); 2) Modelo de lesión avanzada: controles no tratados (n=6), Ad-vacío (n=6), Ad-S3 (n=7). Al finalizar el modelo, los animales fueron sacrificados y se recogieron las muestras histológicas para su posterior estudio (**figura 9**). En otros experimentos para determinar la eficiencia de la transfección génica, los ratones se estudiaron a los 2-14 días de la inyección de Ad-vacío (n=8), Ad-GFP (n=5) o Ad-S3 (n=8).

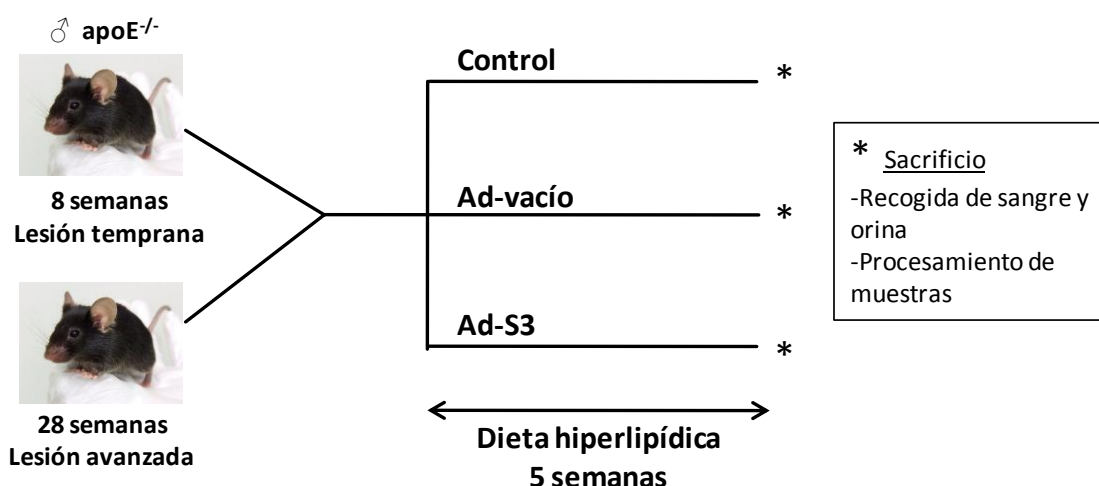


Figura 9. Esquema del protocolo experimental del modelo de aterosclerosis en ratones  $\text{apoE}^{-/-}$  alimentados con dieta hiperlipídica.

#### 7.4. Análisis bioquímicos

Las concentraciones séricas de lípidos (colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos) y transaminasas (aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT)) se midieron por métodos automatizados. Los niveles de hemoglobina glicosilada (GHbA1c) en sangre (Gentauro) y de albúmina en orina (Cell Trend) se midieron mediante ELISA. La concentración de creatinina se determinó enzimáticamente por el método de la creatininas (Abcam).

#### 7.5. Procesamiento de los tejidos

Al final del estudio, los ratones ayunados durante 16 horas se anestesiaron (100 mg/kg ketamina y 15 mg/kg xilazina) y se tomaron muestras de sangre mediante punción retro-orbital. A continuación, tras abrir la cavidad abdominal, se canuló el corazón por el ventrículo izquierdo para perfundir con suero salino realizando una punción de escape en vena cava inferior. Se extrajo la aorta desde el corazón hasta la bifurcación, se limpió para eliminar el tejido graso adherido y se dividió en dos secciones: el arco aórtico (el tercio más cercano al corazón) se incluyó en OCT (Tissue-Tek) para su congelación; los tercios torácico y abdominal se guardaron en  $\text{N}_2$  líquido para estudios de expresión génica. Los riñones extraídos se decapsularon y se pesaron. Una parte se fijó en 4% paraformaldehído y se incluyó en parafina para los estudios histológicos; del resto se obtuvo la corteza renal y se conservó en  $\text{N}_2$  líquido. De forma similar se procesaron muestras de hígado y bazo de los ratones.



## 7.6. Citometría de flujo

El estudio de la citometría se realizó en muestras de bazo, médula ósea (obtenida de fémur de ratón) y sangre tamponada con EDTA. Para obtener la suspensión celular de bazo y médula ósea empleamos un tamiz de 75  $\mu\text{m}$  y lavados con tampón PBS con 1% SFB y 1% BSA. Las suspensiones celulares se trataron con solución de lisis de eritrocitos (Becton Dickinson), se lavaron y se incubaron con una combinación de anticuerpos específicos para las diferentes poblaciones leucocitarias de ratón (**tabla 4**). Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FACS Canto II y el software FACSDiva (BD Biosciences).

| Anticuerpo | Tipo celular        | Casa comercial | Fluorocromo                          |
|------------|---------------------|----------------|--------------------------------------|
| CD45       | Leucocitos totales  | BD Biosciences | FITC (isotiocianato de fluoresceína) |
| CD19       | Linfocitos B        | BD Biosciences | PE (ficoeritrina)                    |
| CD3        | Linfocitos T        | BD Biosciences | PE-Cy7 (cianina 7)                   |
| CD4        | Linfocitos T CD4    | BD Biosciences | PE                                   |
| CD8a       | Linfocitos T CD8    | BD Biosciences | FITC                                 |
| CD115      | Monocitos           | eBioscience    | PE                                   |
| Ly6C       | Monocitos activados | eBioscience    | APC (aloficocianina)                 |

**Tabla 4.** Anticuerpos empleados para la citometría de flujo.

## 8. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

### 8.1. Histología e inmunohistoquímica en riñón

Secciones de 4  $\mu\text{m}$  del tejido renal incluido en parafina se montaron en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina. El tejido se desparafinó con xilol y se hidrató con un gradiente decreciente de etanol. La morfología de los riñones se evaluó mediante microscopía óptica tras tinción con ácido periódico de Schiff (PAS). Para cuantificar las lesiones renales se examinaron mediante doble ciego al menos 30 glomérulos y 20 campos de túbulointersticio de cada animal. El daño glomerular se definió como aumento de la matriz mesangial, proliferación mesangial, aparición de células infiltrantes y dilatación capilar. En los túbulos se evaluó la aparición de lesiones degenerativas del epitelio, atrofia tubular, inclusiones de glucógeno y núcleos claros. En el intersticio se determinó el grado de fibrosis e infiltrado. La tinción se valoró de forma semicuantitativa en una escala de 0 a 3: 0 (negativo), 1 (débil), 2 (moderada) y 3 (intensa). En las muestras renales teñidas con PAS también cuantificamos el área glomerular y el área mesangial mediante morfometría.

Para cuantificar la fibrosis se utilizó la tinción de rojo sirio con ácido pícrico (rojo picrosirio), un colorante para fibras conectivas compuestas principalmente por colágeno. Los cortes

desparafinados se rehidrataron durante 5 días a 4°C en 70% etanol, se lavaron con agua y se tiñeron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El infiltrado renal de linfocitos T y macrófagos se determinó mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CD3 y anti-F4/80, respectivamente (**tabla 5**). Tras desparafinar y rehidratar las muestras se realizó la recuperación antigénica en solución de citrato a pH 6 (PTlink) y se inactivó la peroxidasa endógena con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:metanol (1:1) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las muestras en PBS, se bloquearon las uniones inespecíficas (PBS con 4% BSA y suero del anticuerpo secundario; 1 hora a temperatura ambiente) y se incubaron con los anticuerpos primarios a 4°C durante toda la noche. Tras un lavado con PBS, las secciones se incubaron a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con biotina (1 hora) seguido del complejo avidina-biotina (ABComplex, Dako; 30 minutos) y revelado con 0.05% DAB. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer (Merck), se deshidrataron y se montaron con resina acrílica con base de xileno (DPX, EMS). Para descartar tinción inespecífica se realizó un control negativo de cada muestra omitiendo el anticuerpo primario o usando un anticuerpo no relacionado.

| Tipo celular             | Anticuerpo primario |          | Bloqueo (% Suero)       | Anticuerpo secundario             |          |
|--------------------------|---------------------|----------|-------------------------|-----------------------------------|----------|
|                          | Antígeno            | Dilución |                         | Antígeno (marcaje)                | Dilución |
| Linfocitos T             | CD3 <sup>1</sup>    | 1/200    | 6% caballo <sup>3</sup> | IgG conejo (biotina) <sup>4</sup> | 1/200    |
| Monocitos/<br>macrófagos | F4/80 <sup>2</sup>  | 1/100    | 6% oveja <sup>3</sup>   | IgG rata (biotina) <sup>5</sup>   | 1/200    |

**Tabla 5. Condiciones empleadas para la inmunohistoquímica renal.** Los anticuerpos y sueros fueron administrados por: <sup>1</sup>DAKO, <sup>2</sup>Serotec, <sup>3</sup>Chemicon, <sup>4</sup>GeHealthcare y <sup>5</sup>Thermo Scientific.

Para la cuantificación de las inmunohistoquímicas y otras tinciones (al menos 15 campos por sección renal, aumento x200) se utilizó el Software Image Pro-Plus (Media Cybernetics). La tinción positiva se expresa como porcentaje de área teñida respecto del área total evaluada en cada muestra. Las células F4/80<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> se expresan como número de células positivas por corte transversal glomerular o como número de células intersticiales positivas por mm<sup>2</sup> en cada muestra.

## 8.2. Histología e inmunohistoquímica en aorta

Para el análisis *en face*, la aorta completa se abrió longitudinalmente, se tiñó con Sudan IV y se cuantificaron los depósitos de lípidos. Para evaluar el área y composición de las placas ateroscleróticas empleamos cortes transversales del arco aórtico incluido en OCT. Con la ayuda de un microtomo se obtuvieron cortes seriados de 8 µm a lo largo de ≈1000 µm,

tomando como origen el inicio de las tres válvulas aórticas en el corazón. Las muestras se tiñeron con Oil-Red-O (Sigma) y hematoxilina.

Para la tinción de fibras de colágeno, los cortes se fijaron en 2% formaldehído en salino y se lavaron con etanol. A continuación, se tiñeron durante 2 horas con rojo picrosirio, se lavaron 3 veces con etanol, se deshidrataron con xilol durante 5 minutos y se montaron con DPX. Las tinciones se evaluaron en un microscopio con luz polarizada (DMD108; Leica Microsystems).

Para la detección inmunohistoquímica de macrófagos (MOMA-2) y quimioquinas (CCL2 y CCL5), los cortes de aorta de ratón se fijaron con acetona durante 10 minutos y se inactivó la actividad peroxidasa endógena con 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ :metanol (1:1) durante 30 minutos. A continuación, se eliminaron las uniones inespecíficas con PBS con 4% BSA y suero del huésped en el que se obtuvo el anticuerpo secundario. Los cortes se incubaron entonces a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario (**tabla 6**). Tras lavar las muestras, se añadieron los anticuerpos secundarios conjugados con biotina, diluidos en PBS con 4% BSA y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se trataron con el complejo avidina-biotina (ABComplex; Dako) y el cromógeno DAB, se contrastaron con hematoxilina de Mayer y se montaron con gelatina glicerilada (Merck).

Para la inmunohistoquímica de linfocitos T ( $\text{CD3}^+$  y  $\text{CD4}^+$ ) y de la citoquina  $\text{TNF}\alpha$ , los cortes se fijaron en acetona fría y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (PBS con 1% BSA, 0.1% gelatina, 0.1% Triton-X, 0.05% Tween-20 y 0.05%  $\text{NaN}_3$ ) y 6% suero de la especie del anticuerpo secundario. El anticuerpo primario (**tabla 6**) diluido en PBS conteniendo 1% BSA, 0.1% gelatina y 0.05%  $\text{NaN}_3$  se incubó durante toda la noche a 4°C. Después de bloquear la actividad peroxidasa endógena con 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  en metanol durante 20 minutos a temperatura ambiente, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en PBS, seguido del complejo avidina-biotina (ABComplex; Dako) y el sustrato cromogénico DAB.

La detección de CMLV se realizó mediante inmunofluorescencia directa con un anticuerpo anti- $\alpha$ -actina de músculo liso. La fosforilación de STAT1 y STAT3, así como las isoformas de arginasa (Arg) empleadas como marcadores de macrófagos M1 (ArgII) y M2 (ArgI), se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta (**tabla 6**). Las muestras se tiñeron posteriormente con DAPI y se montaron en Mowiol (Sigma).

La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio invertido de luz visible y epi-fluorescencia (Nikon) con los programas de análisis de imágenes ACT-1 (Nikon) y MetaMorph

(Molecular Devices). La tinción positiva se cuantificó en al menos 3 secciones por ratón (Image-Pro plus) y se expresó como porcentaje o número de células positivas por área de lesión.

| Anticuerpo Primario            |          | Bloqueo<br>(% Suero)    | Anticuerpo secundario                      |          |
|--------------------------------|----------|-------------------------|--------------------------------------------|----------|
| Antígeno                       | Dilución |                         | Antígeno (marcaje)                         | Dilución |
| MOMA-2 <sup>1</sup>            | 1/800    | 10% conejo <sup>8</sup> | IgG rata (biotina) <sup>9</sup>            | 1/1000   |
| CCL2/MCP-1 <sup>2</sup>        | 1/30     | 8% caballo <sup>8</sup> | IgG cabra (biotina) <sup>10</sup>          | 1/500    |
| CD3 <sup>3</sup>               | 1/200    | 8% caballo <sup>8</sup> | IgG conejo (biotina) <sup>10</sup>         | 1/400    |
| CD4 <sup>4</sup>               | 1/40     | 8% conejo <sup>8</sup>  | IgG rata (biotina) <sup>9</sup>            | 1/400    |
| TNFα <sup>2</sup>              | 1/20     | 6% caballo <sup>8</sup> | IgG cabra (biotina) <sup>10</sup>          | 1/200    |
| CCL5/RANTES <sup>5</sup>       | 1/100    | 8% caballo <sup>8</sup> | IgG conejo (biotina) <sup>10</sup>         | 1/300    |
| α-actina-FITC <sup>6</sup>     | 1/200    | 6% de BSA <sup>6</sup>  | -                                          | -        |
| P-STAT1 (Tyr701) <sup>11</sup> | 1/40     | 8% oveja <sup>8</sup>   | IgG conejo (Alexa Fluor 568) <sup>11</sup> | 1/200    |
| P-STAT3 (Tyr705) <sup>7</sup>  | 1/20     | 8% caballo <sup>8</sup> | IgG cabra (Alexa Fluor 488) <sup>11</sup>  | 1/200    |
| Argl <sup>2</sup>              | 1/10     | 8% caballo <sup>8</sup> | IgG cabra (Alexa Fluor 568) <sup>11</sup>  | 1/200    |
| Argl <sup>2</sup>              | 1/10     | 8% oveja <sup>8</sup>   | IgG conejo (Alexa Fluor 564) <sup>10</sup> | 1/200    |

**Tabla 6. Condiciones empleadas para la inmunohistoquímica en aorta.** Los reactivos fueron administrados por: <sup>1</sup>Serotec, <sup>2</sup>Santa Cruz, <sup>3</sup>DAKO, <sup>4</sup>BD Biosciences, <sup>5</sup>Ab online, <sup>6</sup>Sigma, <sup>7</sup>Cell Signaling, <sup>8</sup>Chemicon, <sup>9</sup>Thermo scientific, <sup>10</sup>GeHealthcare y <sup>11</sup>Invitrogen.

### 8.3. Southwestern *in situ*

Esta técnica se emplea para detectar en los tejidos la distribución del factor de transcripción NF-κB activado. El oligonucleótido conteniendo la secuencia consenso de NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') y su secuencia complementaria se dimerizaron a 80°C durante 2 minutos y se marcaron con digoxigenina empleando la transferasa 3'-terminal (Roche).

Los cortes de riñón desparafinados e hidratados se fijaron con 0.5% paraformaldehído (25 minutos a 28°C), se trataron con 5 mM levamisole en PBS (30 minutos a temperatura ambiente) para bloquear la fosfatasa alcalina endógena y después con 0.5% pepsina en 1 N HCl (35 minutos a 37°C) y 0.1 mg/mL DNasa I en tampón HEPES-BSA (10 mM HEPES pH 7.4, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.25% BSA; 30 minutos a 30°C). Los cortes de aorta en OCT se trataron durante 25 minutos con cloroformo, se fijaron con 0.5% paraformaldehído y se trataron con 5 mM levamisole en PBS (30 minutos a temperatura ambiente) y 0.1 mg/mL DNasa I (Roche) en tampón HEPES-BSA (30 minutos a 30°C).

Las muestras de riñón y aorta se incubaron durante toda la noche a 37°C con 6-12 pmoles de la sonda NF-κB marcada con digoxigenina diluida en HEPES-BSA conteniendo 2 µg/mL

poli(dI-dC). El color se desarrolló por incubación con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (1/200, 2 horas a 37°C) y el sustrato NBT/BCIP (cloruro de nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato de p-toluidina; Roche). Tras parar la reacción con 10 mM Tris pH 8.0 y 1 mM EDTA, los cortes se montaron con 90% glicerol en PBS. Como control de especificidad empleamos paralelamente cortes teñidos en ausencia de sonda NF- $\kappa$ B marcada.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las valoraciones se determinaron por duplicado o triplicado. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (EEM) del número total de experimentos (estudios *in vitro*) o de animales (estudios *in vivo*). El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 5 (Graphpad Software) empleando el test de ANOVA (una o dos vías) seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples y considerando diferencias significativas aquellas con valores de  $P < 0.05$ .

## **IV.RESULTADOS**



## PARTE I: MODULACIÓN ESPECÍFICA DE LA ACTIVIDAD INFLAMATORIA DE NF- $\kappa$ B EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROPATÍA Y ATEROSCLEROSIS ASOCIADAS A DIABETES

La respuesta inflamatoria asociada a la diabetes y sus complicaciones está mediada por numerosas proteínas inflamatorias, cuya expresión está estrictamente regulada a nivel intracelular por diversos factores de transcripción. Entre ellos, destaca la vía NF- $\kappa$ B, cuya activación se ha demostrado tanto en células sanguíneas como en muestras de riñón y placas ateroscleróticas de pacientes diabéticos y modelos animales (25, 86, 87). La vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B está mediada por el complejo IKK, formado por las subunidades catalíticas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) y la subunidad reguladora (NEMO o IKK $\gamma$ ). IKK fosforila la proteína inhibidora I $\kappa$ B para su posterior poliubiquitinación y degradación, liberándose así el complejo NF- $\kappa$ B activo (heterodímero p65-p50), que se transloca al núcleo para regular la transcripción génica de proteínas inflamatorias.

Considerando que la vía NF- $\kappa$ B es una buena diana para la terapia antiinflamatoria en las complicaciones diabéticas (nefropatía y aterosclerosis), diseñamos un pequeño péptido sintético con permeabilidad celular y que contiene la región NBD esencial para la unión y estabilización del complejo IKK (ver esquema de la **figura 7** en la página 27) (122). De esta forma, conseguimos inhibir únicamente la vía inflamatoria NF- $\kappa$ B sin afectar su actividad basal necesaria para los procesos celulares fisiológicos, reduciéndose así posibles efectos adversos. Las acciones antiinflamatorias del péptido NBD se estudiaron *in vitro* en cultivos de células renales (mesangiales glomerulares y túbuloepiteliales) y vasculares estimuladas en condiciones de hiperglucemia e inflamación. Asimismo, el efecto renoprotector y antiaterosclerótico del péptido NBD se analizó *in vivo* en un modelo experimental de diabetes tipo 1 en ratones hipercolesterolémicos.

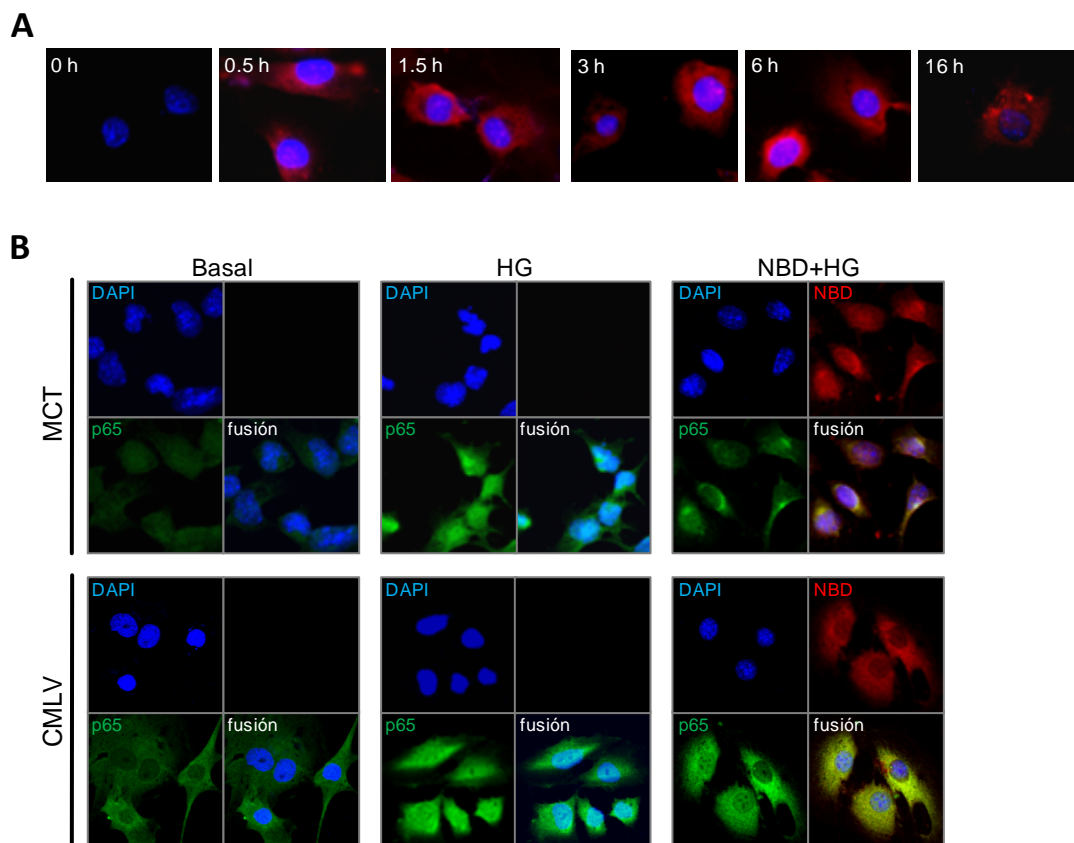
### 1. ACCIONES *IN VITRO* DEL PÉPTIDO INHIBIDOR NBD

Investigamos los efectos renales y vasculares del péptido NBD en diferentes sistemas celulares murinos: línea de células epiteliales de túbulo proximal (MCT), cultivo primario de células mesangiales (CM) y células de músculo liso vascular (CMLV). Las células se privaron de suero durante 24 horas y se pretrataron con los péptidos permeables (secuencia inhibidora NBD y su control mutante (Mut)) durante 90 minutos antes de la estimulación con alta concentración de glucosa (HG, 30 mM D-glucosa) o con lipopolisacárido (LPS, 1  $\mu$ g/mL) para evaluar posteriormente la expresión de genes y las respuestas biológicas.



### 1.1. Inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B por el péptido NBD

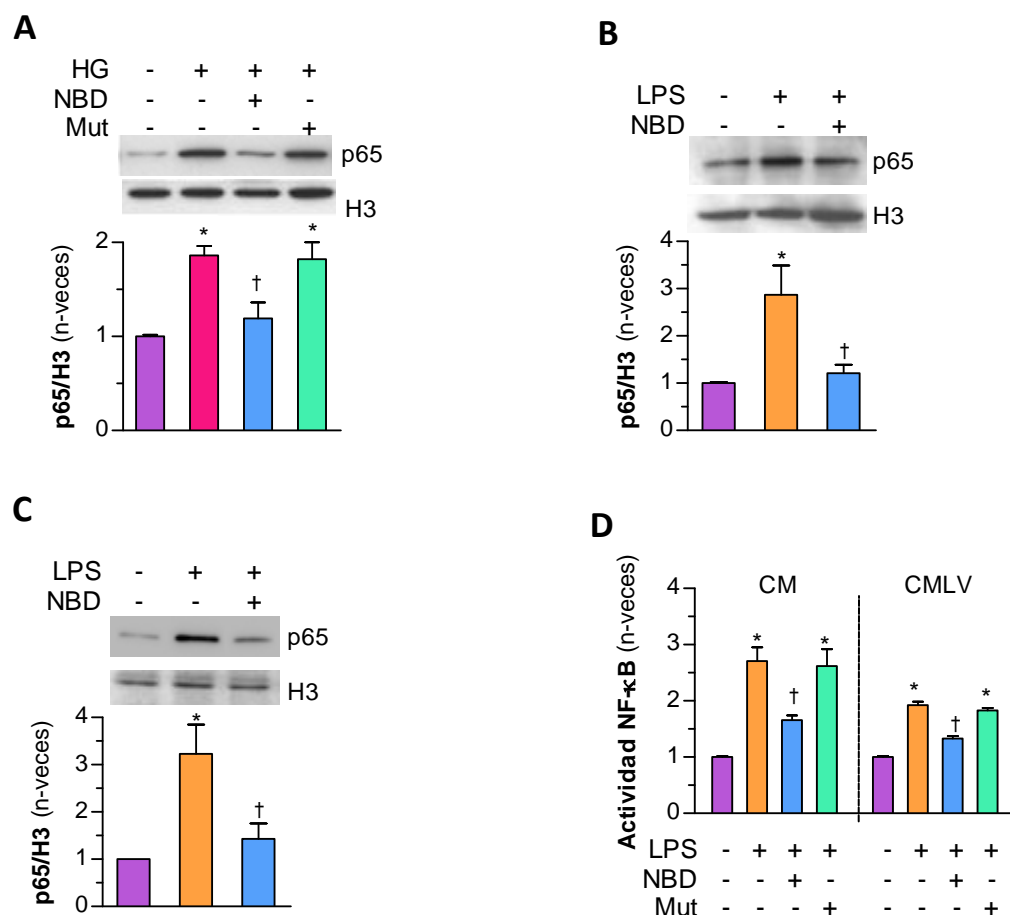
Mediante experimentos de fluorescencia comprobamos que tanto las células vasculares (CMLV; **figura 10, A y B**) como las renales (MCT; **figura 10B**) eran capaces de internalizar el péptido NBD marcado con rodamina. En ambos tipos celulares se detectó también la localización nuclear de p65 como indicador de la activación canónica de NF- $\kappa$ B. Como se observa en la **figura 10B**, la estimulación con HG concentró la proteína p65 en el núcleo celular y este efecto fue inhibido por el péptido NBD.



**Figura 10. Localización celular del péptido NBD y la proteína p65. (A)** Internalización del péptido NBD-rodamina en CMLV a distintos tiempos. **(B)** Localización de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en MCT y CMLV estimuladas con HG (30 mM D-glucosa, 60 minutos) en presencia o ausencia del péptido NBD-rodamina (2  $\mu$ M). Las imágenes de microscopía confocal (rojo, NDB; verde, p65; azul, núcleos) son ilustrativas de 3-4 experimentos independientes.

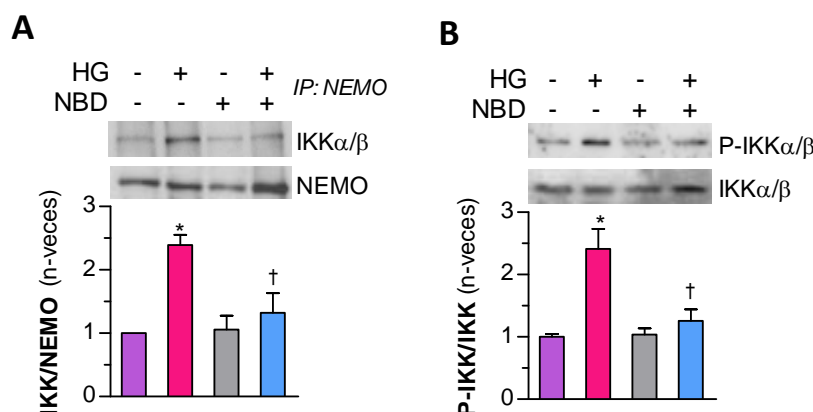
Para corroborar estos datos, se analizó mediante Western blot la presencia de la subunidad p65 en los extractos nucleares de células renales. Observamos que la estimulación de CM con HG (**figura 11A**) o con LPS (**figura 11B**) aumentó los niveles nucleares de p65, un efecto que se inhibió en presencia del péptido NBD. De manera similar, la preincubación de CMLV con NBD redujo la translocación nuclear de p65 inducida por LPS (**figura 11C**). Además de la

translocación nuclear de p65, estudiamos su actividad de unión al DNA mediante ELISA (**figura 11D**), detectando una disminución significativa en presencia del péptido NBD. Por el contrario, no observamos efectos significativos en las células pretratadas con el péptido mutante empleado como control estructural en estos experimentos (**figura 11, A y D**).



**Figura 11. El péptido NBD inhibe la activación de NF-κB *in vitro*.** Las células tratadas con los péptidos permeables (NBD y Mut, 2 μM, 90 minutos) se estimularon con HG (30mM D-glucosa, 60 minutos) o LPS (1 μg/mL, 30 minutos). (**A-C**) Análisis Western blot de p65 e histona H3 (control de carga) en extractos nucleares de CM (**A, B**) y CMLV (**C**). Se muestran geles representativos y el análisis densitométrico normalizado. (**D**) ELISA de la actividad de unión al DNA de p65 en extractos nucleares. Los datos son media±EEM de 3-5 experimentos independientes. \*P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo.

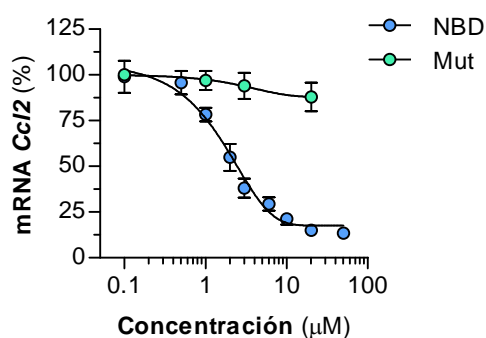
Para comprobar si el péptido NBD bloquea efectivamente el ensamblaje entre las subunidades IKKα, IKKβ y NEMO en el complejo de quinasa, realizamos ensayos de inmunoprecipitación y Western blot. Como se observa en la **figura 12A**, NBD previno la interacción entre NEMO e IKKα/β inducida por HG en las CM, pero no afectó a los niveles basales. Asimismo, el péptido NBD inhibió la fosforilación en Ser176/180 de IKKα/β en las CM estimuladas con HG (**figura 12B**).



**Figura 12. El péptido NBD inhibe la activación de IKK. (A)** Coinmunoprecipitación de las subunidades NEMO e IKKα/β en CM estimuladas con HG en ausencia o presencia del péptido NBD. **(B)** Niveles de fosforilación en Ser176/180 de IKKα/β en extractos de CM. Se muestran geles representativos y el análisis densitométrico normalizado. Media±EEM de 4 experimentos independientes. \*P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo.

## 1.2. Inhibición de genes dependientes de NF-κB por el péptido NBD

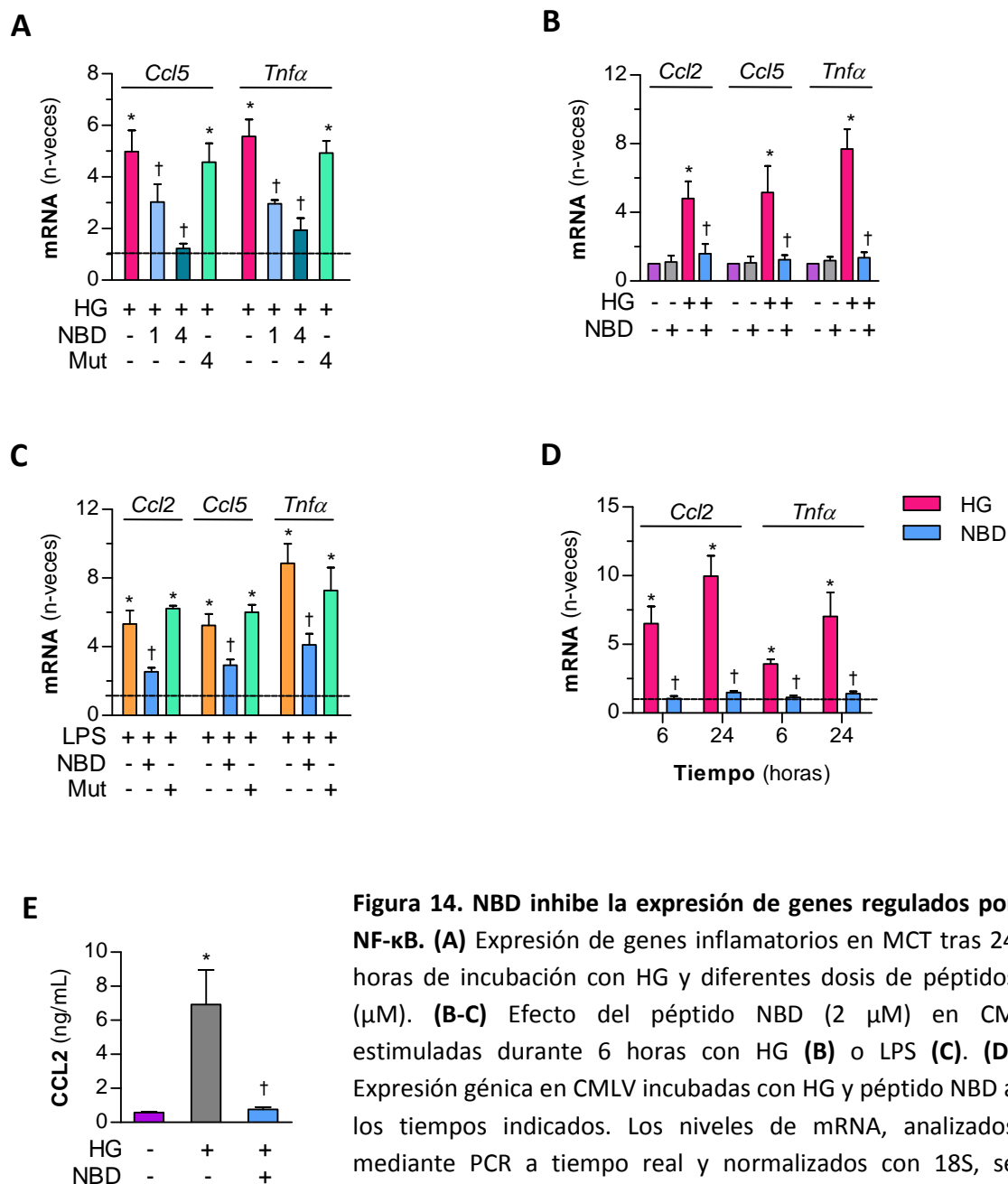
Entre los genes regulados por NF-κB, estudiamos la expresión de las quimioquinas CCL2 y CCL5 y de la citoquina TNFα, tres mediadores importantes en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes. El análisis por PCR cuantitativa a tiempo real en células tubulares MCT bajo condiciones de hiperglucemia (30 mM D-glucosa, 24 horas) demostró que el péptido NBD, pero no la secuencia mutada, era capaz de reducir de forma dosis-dependiente la expresión de CCL2 (**figura 13**), CCL5 y TNFα (**figura 14A**), con una eficiencia de inhibición (IC<sub>50</sub> = 2.1-3.4 μM) similar a otros estudios *in vitro* (84, 123).



**Figura 13. Curva dosis-respuesta de los péptidos NBD y Mut.** La expresión de CCL2 en MCT estimuladas con HG se determinó mediante PCR a tiempo real. Los niveles de mRNA normalizados con 18S se expresan como porcentaje vs estímulo. Media±EEM de 4 experimentos.

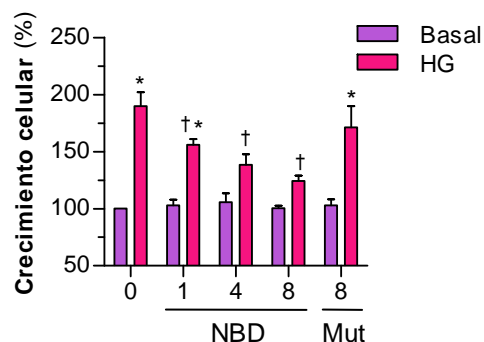
De forma análoga, el péptido NBD disminuyó significativamente la expresión de genes proinflamatorios, tanto en CM estimuladas con HG (**figura 14B**) o LPS (**figura 14C**), como en CMLV incubadas con HG a diferentes tiempos (**figura 14D**). El péptido NBD también previno

la secreción de la quimioquina CCL2 al medio extracelular, medida por ELISA en los sobrenadantes de CM (**figura 14E**).



**Figura 14. NBD inhibe la expresión de genes regulados por NF-κB.** (A) Expresión de genes inflamatorios en MCT tras 24 horas de incubación con HG y diferentes dosis de péptidos (μM). (B-C) Efecto del péptido NBD (2 μM) en CM estimuladas durante 6 horas con HG (B) o LPS (C). (D) Expresión génica en CMLV incubadas con HG y péptido NBD a los tiempos indicados. Los niveles de mRNA, analizados mediante PCR a tiempo real y normalizados con 18S, se expresan como incremento vs basal (línea discontinua). (E) ELISA de CCL2 en los sobrenadantes de CM a las 6 horas de estimulación con HG. Media±EEM (4-6 experimentos). \*P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo.

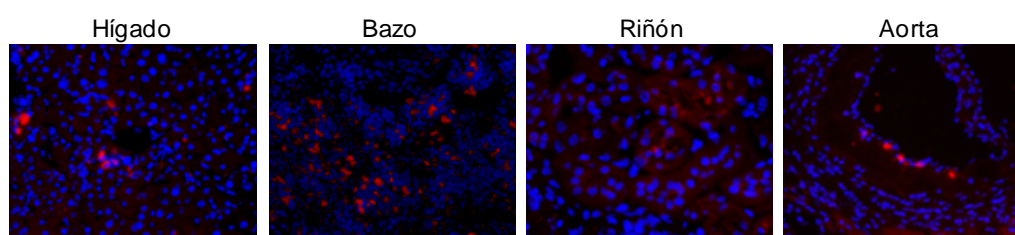
En otra serie de experimentos observamos que NBD fue capaz de inhibir de forma dosis-dependiente la proliferación de las CM en condiciones de hiperglucemia, mientras que no afectó la viabilidad celular en condiciones basales (**figura 15**).



**Figura 15. Estudios de proliferación y viabilidad celular.** Ensayo de MTT en CM incubadas durante 48 horas en condiciones basales e hiperglucémicas (HG, 30 mM D-glucosa) y en presencia de diferentes concentraciones de péptidos (μM). Los valores son la media±EEM de 4 experimentados por triplicado. \*P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs HG.

## 2. EFECTOS *IN VIVO* DEL PÉPTIDO NBD EN LA DIABETES EXPERIMENTAL

Una vez comprobada la capacidad del péptido NBD de inhibir *in vitro* el factor NF-κB y sus genes dependientes en células renales y vasculares, quisimos analizar su posible efecto *in vivo* en el modelo experimental de diabetes tipo 1 inducida por STZ en ratones apoE<sup>-/-</sup>. Estudios previos han descrito que la combinación de hiperglucemia e hiperlipidemia en estos ratones apoE<sup>-/-</sup> acelera el desarrollo de nefropatía y aterosclerosis, en comparación con las dos alteraciones por separado (120, 124, 125). En un primer experimento comprobamos, mediante microscopía de fluorescencia *ex vivo* con NBD marcado con rodamina, que el péptido permeable inyectado por vía intraperitoneal (4 μmol/kg peso) llegaba de forma efectiva a los tejidos diana de los ratones apoE<sup>-/-</sup>, localizándose en hígado, bazo, riñón y aorta (**figura 16**). A continuación se resumen los resultados obtenidos en el modelo experimental de diabetes.

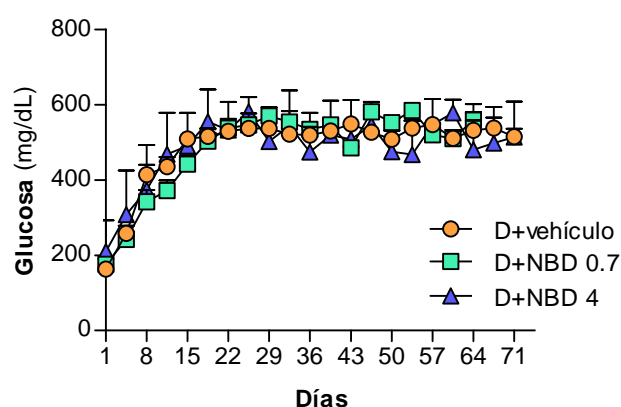


**Figura 16. Distribución tisular de NBD fluorescente en ratones apoE<sup>-/-</sup> a las 16 horas de inyección.** Imágenes representativas de 3 experimentos (rojo, NBD; azul, núcleos DAPI).

### 2.1. Evolución del modelo de diabetes experimental en ratones apoE<sup>-/-</sup>

En estos estudios se utilizaron ratones macho de 10 semanas de edad que, una vez establecida la diabetes (glucemia >350mg/dL), fueron divididos en tres grupos de tratamiento: vehículo (0.1% acetonitrilo, n=9), dosis baja de NBD (0.7 μmol/kg peso, n=7) y dosis alta de NBD (4 μmol/kg peso, n=9). Como grupos control empleamos ratones normoglucémicos tratados con vehículo o dosis alta de NBD (n=4 animales por grupo).

En primer lugar analizamos los parámetros bioquímicos y metabólicos de los ratones tratados con vehículo o con el péptido NBD durante un periodo de 10 semanas. Las curvas de evolución de glucemia a lo largo del estudio fueron similares en todos los grupos diabéticos (**figura 17**). Al finalizar el modelo, observamos que el tratamiento con NBD no alteró la glucemia (niveles de glucosa y GHbA1c), el peso corporal ni el perfil lipídico de los ratones, tanto en los grupos no diabéticos como diabéticos (**tabla 7**). Tampoco se detectaron diferencias significativas en los niveles séricos de las transaminasas hepáticas (**tabla 7**), indicando una baja toxicidad del péptido NBD a las dosis empleadas.



**Figura 17. Evolución de la glucemia en el modelo de diabetes.** Niveles de glucosa (media±EEM) en sangre de ratones diabéticos tratados con vehículo o con péptido NBD (0.7 y 4  $\mu\text{mol/kg}$ ) durante 10 semanas.

|                                   | NO DIABÉTICOS     |                | DIABÉTICOS        |                  |                |
|-----------------------------------|-------------------|----------------|-------------------|------------------|----------------|
|                                   | Vehículo<br>(n=4) | NBD 4<br>(n=4) | Vehículo<br>(n=9) | NBD 0.7<br>(n=7) | NBD 4<br>(n=9) |
| $\Delta$ Peso (final-inicial) (g) | 2.2±0.2           | 2.3±0.6        | 2.2±0.4           | 1.9±0.2          | 1.6±0.2        |
| Glucosa (mg/dL)                   | 8.9±0.4           | 9.3±0.2        | 29.9±0.8*         | 29.9±1.5*        | 28.9±2.0*      |
| GHbA1c ( $\mu\text{g/mL}$ )       | n.d.              | n.d.           | 478±71            | 486±29           | 448±47         |
| Colesterol (mmol/L)               | 8.5±0.5           | 8.6±0.5        | 15.6±0.4*         | 15.9±0.6*        | 16.0±1.4*      |
| LDL (mmol/L)                      | 8.0±0.2           | 8.3±0.1        | 14.9±0.4*         | 14.7±1.1*        | 14.5±1.4*      |
| HDL (mmol/L)                      | 0.34±0.03         | 0.41±0.01      | 0.31±0.03         | 0.37±0.03        | 0.28±0.02      |
| TG (mmol/L)                       | 0.6±0.1           | 0.7±0.1        | 0.9±0.1           | 0.9±0.1          | 0.9±0.1        |
| AST ( $\mu\text{kat/L}$ )         | 3.0±0.3           | 3.0±0.5        | 3.6±0.2           | 3.4±0.7          | 3.3±0.6        |
| ALT ( $\mu\text{kat/L}$ )         | 1.9±0.2           | 1.7±0.5        | 2.1±0.2           | 2.0±0.4          | 2.0±0.3        |

**Tabla 7. Parámetros bioquímicos de ratones no diabéticos y diabéticos a las 10 semanas de tratamiento.** Los resultados son media±EEM del total de animales por grupo. \*P<0.05 vs no diabéticos+vehículo. *Abreviaturas:* GHbA1c, hemoglobina glicosilada; TG, triglicéridos; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; n.d., no determinado.

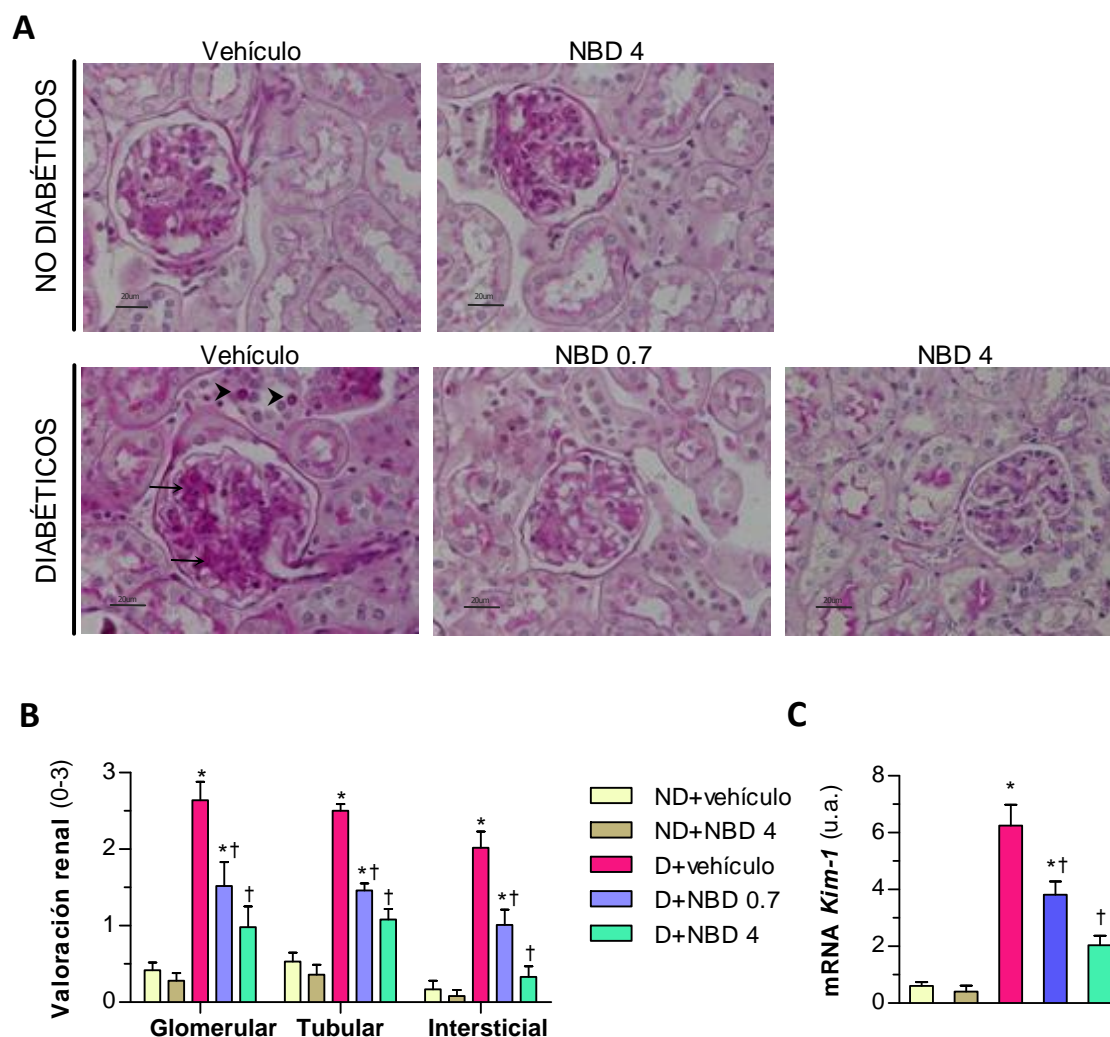
## 2.2. El tratamiento con el péptido NBD atenúa el daño renal inducido por la diabetes experimental

Como parámetros indicativos de disfunción renal se midió la creatinina sérica, la relación albúmina/creatinina en orina y el peso renal relativo (peso renal/peso corporal). El tratamiento con el péptido NBD mejoró de manera dosis-dependiente la función renal en los ratones diabéticos sin afectar significativamente los niveles de los no diabéticos (**tabla 8**).

|                                     | NO DIABÉTICOS     |                | DIABÉTICOS        |                        |                        |
|-------------------------------------|-------------------|----------------|-------------------|------------------------|------------------------|
|                                     | Vehículo<br>(n=4) | NBD 4<br>(n=4) | Vehículo<br>(n=9) | NBD 0.7<br>(n=7)       | NBD 4<br>(n=9)         |
| PRR (g/kg)                          | 15.3±0.6          | 14.6±0.7       | 20.0±1.3*         | 17.7±1.1               | 15.7±0.7 <sup>†</sup>  |
| SCr (μmol/L)                        | 7.1±1.8           | 6.2±2.6        | 34.5±3.5*         | 22.9±1.8* <sup>†</sup> | 20.3±2.6* <sup>†</sup> |
| UAC (μg/μmol)                       | 8.2±0.6           | 7.8±0.2        | 24.4±1.5*         | 19.4±0.5* <sup>†</sup> | 13.9±1.2 <sup>†</sup>  |
| Área glomerular (μm <sup>2</sup> )  | 2188±165          | 2146±209       | 3949±264*         | 3014±154* <sup>†</sup> | 2555±182* <sup>†</sup> |
| Área mesangial PAS <sup>+</sup> (%) | 7.0±0.2           | 7.4±0.1        | 13.8±1.0*         | 10.0±0.4* <sup>†</sup> | 8.6±0.6* <sup>†</sup>  |

**Tabla 8. Parámetros renales de ratones no diabéticos y diabéticos.** Los resultados son media±EEM del total de animales por grupo. \*P<0.05 vs no diabéticos+vehículo y <sup>†</sup>P<0.05 vs diabéticos+vehículo. *Abreviaturas:* PRR, peso renal relativo; SCr, creatinina sérica; UAC, albúmina/creatinina en orina.

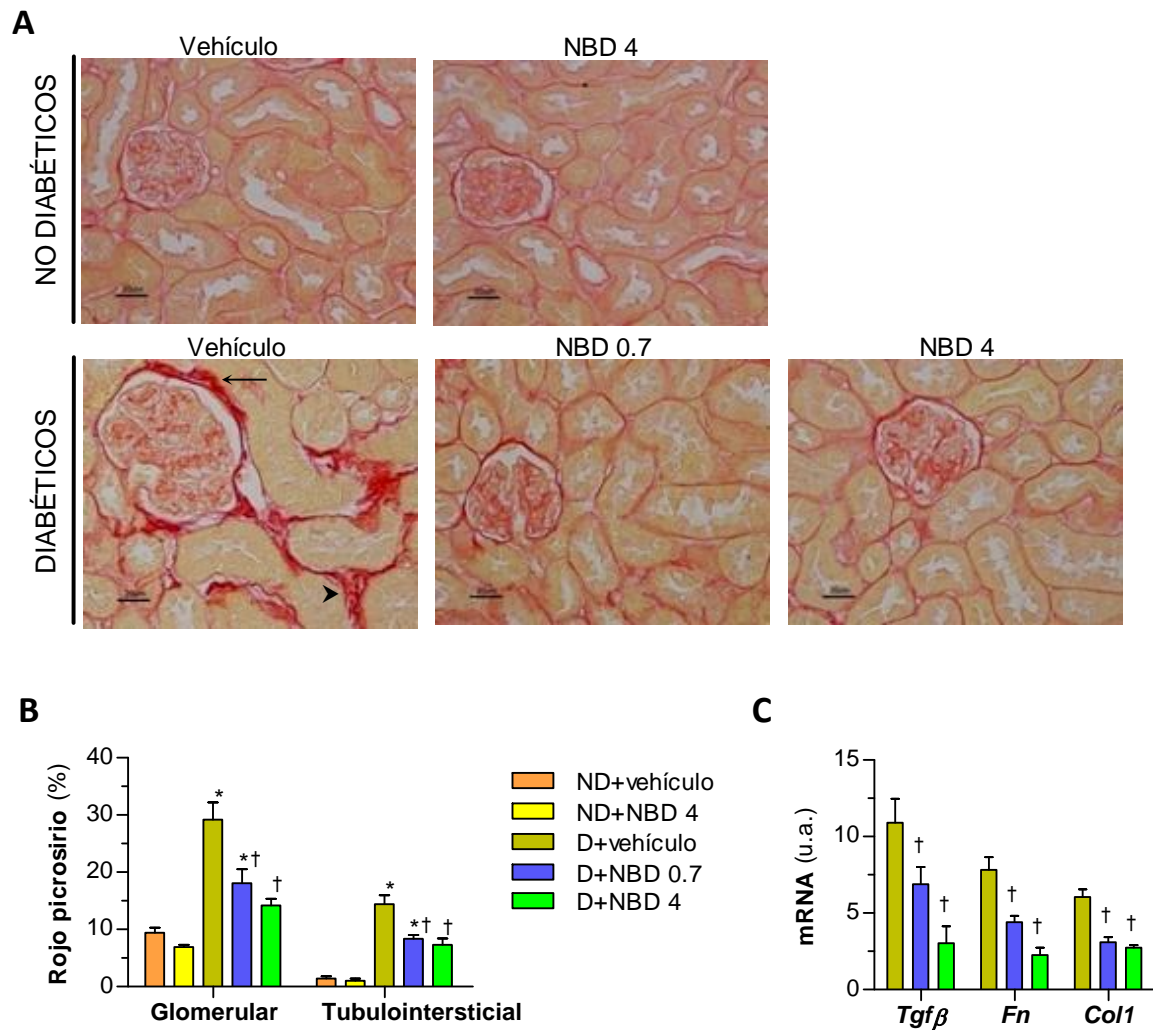
Para comprobar si los cambios bioquímicos se correlacionaban con cambios en la morfología renal, analizamos mediante tinción PAS los cortes renales procedentes de los diferentes grupos de estudio (**figura 18A**). La valoración histológica del daño renal demostró que el tratamiento con el péptido NBD mejora los cambios patológicos asociados con la diabetes. En concreto, observamos una reducción significativa del tamaño glomerular, la hiper celularidad y la expansión de la matriz mesangial (**figura 18B y tabla 8**). El tratamiento también disminuyó el daño tubular (atrofia y dilatación) así como la fibrosis y el infiltrado intersticial (**figura 18B**). Esta mejora en los cambios estructurales se confirmó mediante análisis de la expresión del marcador de daño tubular KIM-1 (molécula de daño renal-1; **figura 18C**), observando un descenso significativo en los ratones diabéticos tratados con péptido NBD en comparación con los que recibieron vehículo.



**Figura 18. El péptido NBD reduce el daño renal inducido por la diabetes. (A)** Histopatología renal (tinción con PAS) de ratones apoE<sup>-/-</sup> no diabéticos y diabéticos tratados con vehículo y péptido NBD (0.7 y 4 μmol/kg) durante 10 semanas. Imágenes representativas (ampliación x200). Los ratones diabéticos presentan hipertrofia glomerular, expansión intraglomerular del área PAS<sup>+</sup> (flechas), atrofia tubular y depósitos de glucógeno (puntas de flecha). **(B)** Valoración semicuantitativa (escala 0-3) de las lesiones renales en los grupos no diabéticos (ND) y diabéticos (D). **(C)** Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión de mRNA de *Kim-1*. Los valores normalizados con la expresión de 18S se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Media±EEM del número total de animales por grupo (\*P<0.05 vs no diabéticos+vehículo; †P<0.05 vs diabéticos+vehículo).

Analizamos con más detalle la fibrosis renal mediante tinción de fibras de colágeno con rojo picosirio, observando una disminución significativa del área fibrótica en los glomérulos y el túbulointersticio de los animales diabéticos tratados con péptido NBD (**figura 19, A y B**). Asimismo, el tratamiento redujo los niveles de expresión de mRNA del factor profibrótico TGF-β y de las proteínas de matriz extracelular fibronectina y colágeno tipo 1 (**figura 19C**).

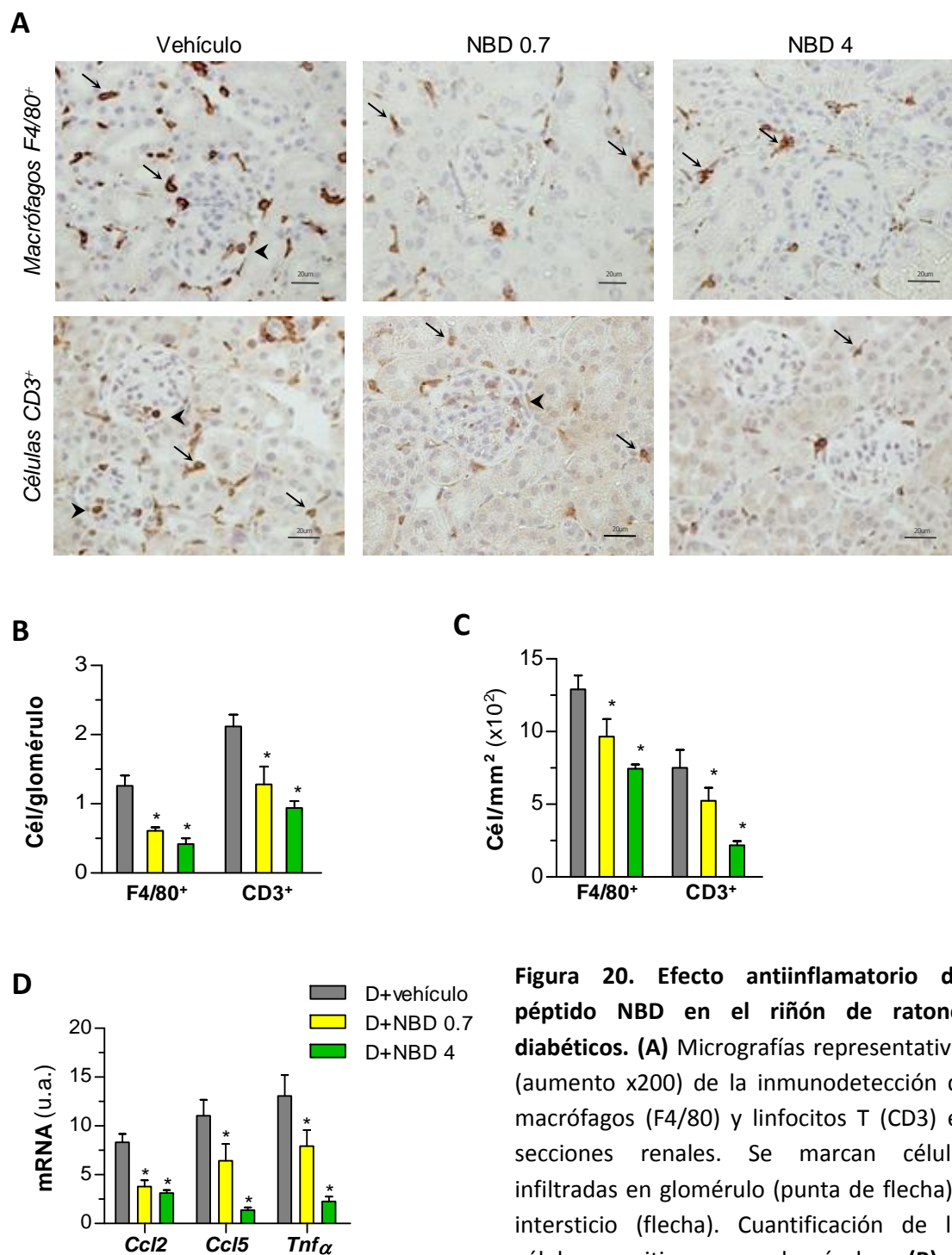




**Figura 19. Disminución de la fibrosis renal por administración de NBD. (A)** Imágenes representativas (ampliación x200) de la tinción de colágeno con rojo picrosirio en animales no diabéticos y diabéticos. Se marcan los depósitos de colágeno en glomérulo (flecha) e intersticio (punta de flecha) de un ratón diabético tratado con vehículo. **(B)** Cuantificación del área positiva glomerular y túbulointersticial en los grupos no diabéticos (ND) y diabéticos (D). **(C)** PCR a tiempo real de la expresión de mRNA de genes profibróticos en corteza renal de ratones diabéticos. Los valores normalizados con 18S se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Media±EEM del total de animales por grupo (\* $P < 0.05$  vs no diabéticos+vehículo; † $P < 0.05$  vs diabéticos+vehículo).

Para determinar el efecto del péptido NBD en la respuesta inflamatoria del riñón diabético, analizamos mediante tinción de inmunoperoxidasa el infiltrado de monocitos/macrófagos (F4/80) y linfocitos T (CD3). En comparación con el grupo control (vehículo) los ratones diabéticos tratados con NBD mostraron una reducción dosis-dependiente y significativa del número de leucocitos infiltrados, tanto en el glomérulo como en el intersticio (**figura 20, A-C**). Del mismo modo, el análisis de genes inflamatorios mediante PCR cuantitativa mostró

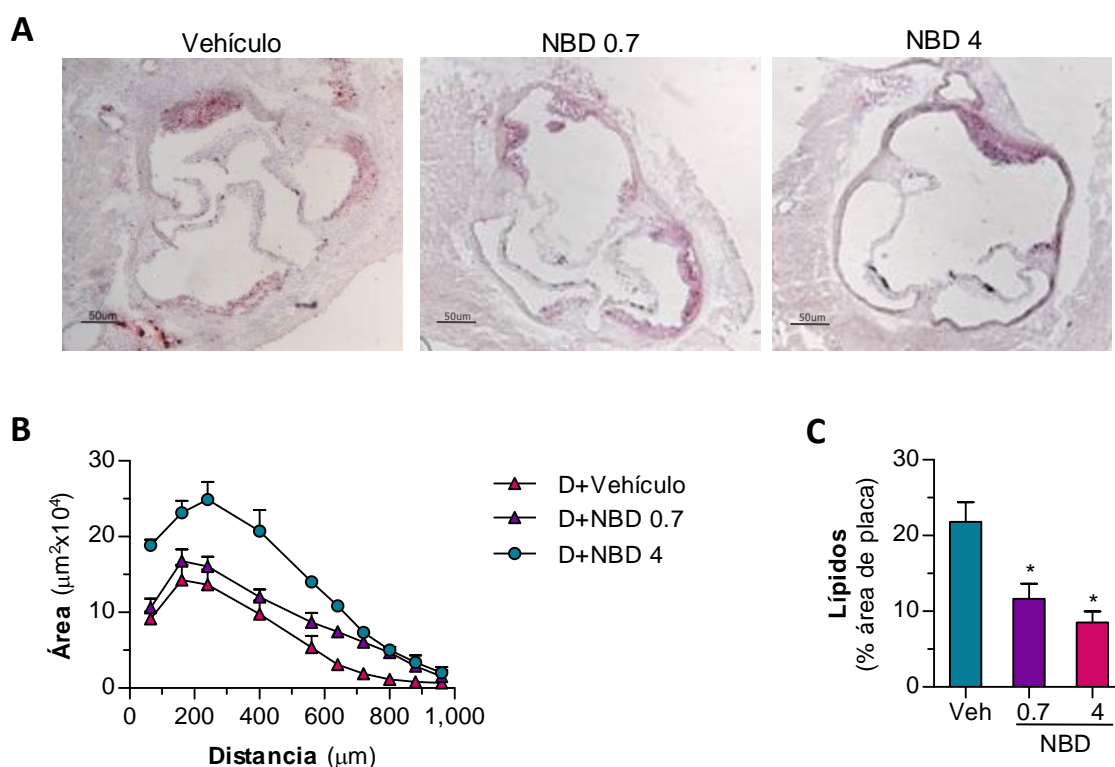
una menor expresión de mRNA de las quimioquinas CCL2 y CCL5 y de la citoquina TNF $\alpha$  en los riñones de ratones diabéticos tratados con NBD (**figura 20D**).



**Figura 20. Efecto antiinflamatorio del péptido NBD en el riñón de ratones diabéticos. (A)** Micrografías representativas (aumento x200) de la inmunodetección de macrófagos (F4/80) y linfocitos T (CD3) en secciones renales. Se marcan células infiltradas en glomérulo (punta de flecha) e intersticio (flecha). Cuantificación de las células positivas en glomérulos **(B)** e intersticio **(C)**. **(D)** PCR a tiempo real de la expresión de genes proinflamatorios en corteza renal. Los valores normalizados por 18S se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Media $\pm$ EEM del número total de animales por grupo (\*P<0.05 vs vehículo).

### 2.3. La terapia con el péptido NBD limita el desarrollo de aterosclerosis en los ratones diabéticos

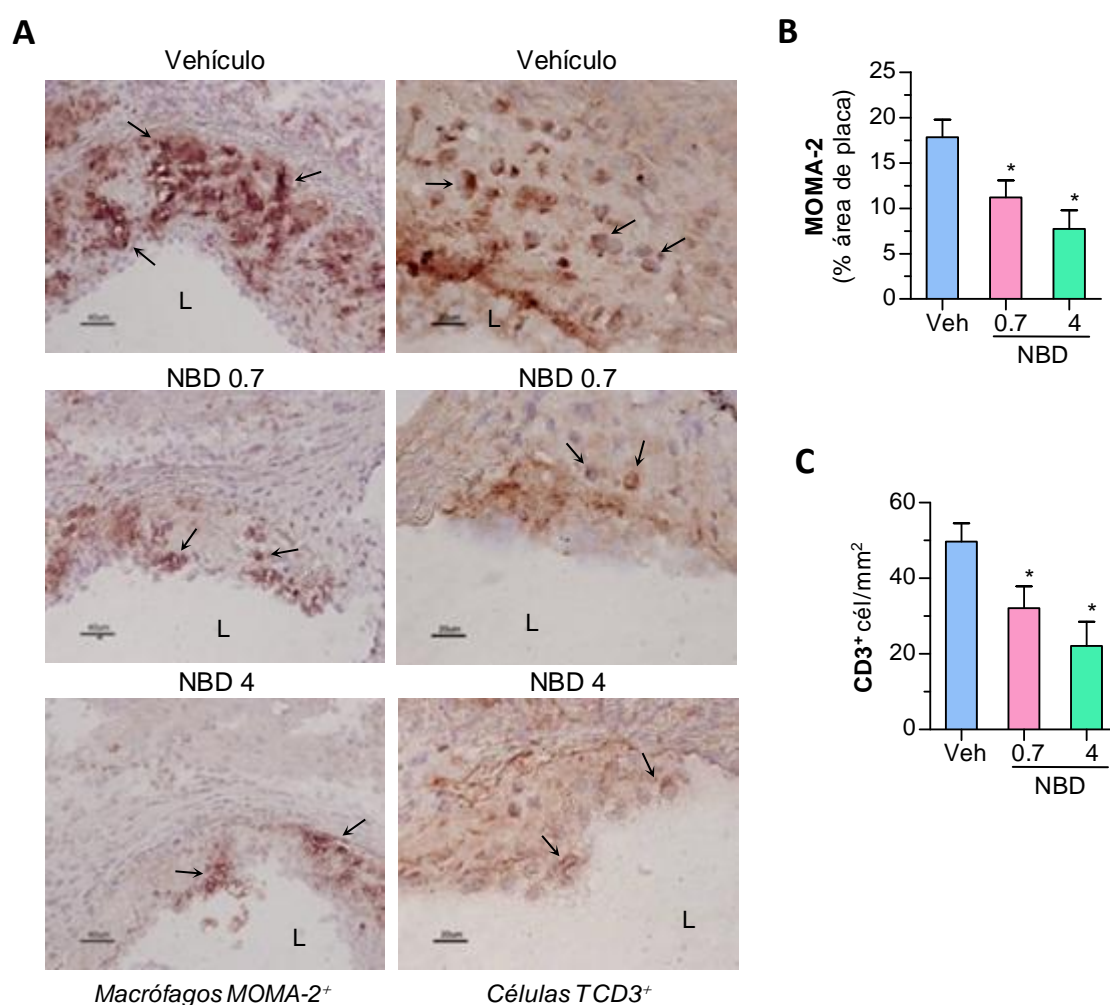
Estudios previos de nuestro grupo (120, 125) han demostrado que los ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos, debido a su severa dislipidemia e hiperglucemia, desarrollan placas ateroscleróticas de mayor tamaño y complejidad que los ratones no diabéticos. Por tanto, en este trabajo comparamos las lesiones ateroscleróticas de ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos tratados con vehículo y dos dosis del péptido NBD (0.7 y 4 µmol/kg). La cuantificación del área de la lesión se realizó en cortes seriados del arco aórtico teñidos con Oil-red-O/hematoxilina (**figura 21A**). En comparación con el grupo tratado con vehículo, los animales diabéticos tratados con péptido NBD mostraron una disminución del tamaño de las lesiones ateroscleróticas (% reducción: NBD 0.7: 35±6, P<0.05; NBD 4: 45±8; P<0.01) y su extensión a lo largo de la aorta (**figura 21B**), así como del contenido lipídico (**figura 21C**).



**Figura 21. El péptido NBD atenúa la aterosclerosis en ratones diabéticos. (A)** Fotomicrografías representativas (aumento x40) de la tinción Oil-red-O/hematoxilina en secciones del arco aórtico de ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos después de 10 semanas de tratamiento. **(B)** Medida del área de lesión aterosclerótica a lo largo de la aorta. **(C)** Cuantificación del contenido lipídico (área teñida con Oil-red-O). Los datos son media±EEM del número total de animales por grupo (\*P<0.05 vs vehículo).

## 2.4. El tratamiento con NBD altera la composición de las placas de ateroma y reduce la inflamación sistémica

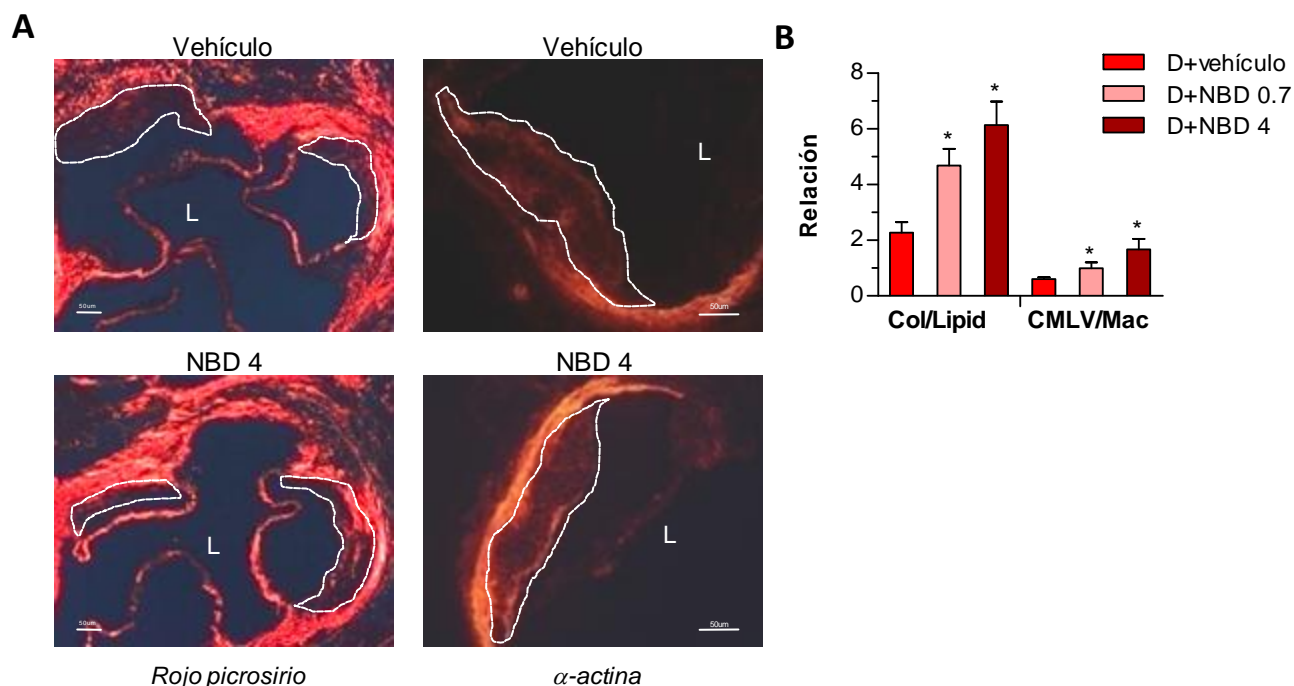
Por su importancia en la patogenia de la aterosclerosis, analizamos mediante inmunohistoquímica el contenido de monocitos/macrófagos (MOMA-2) y linfocitos T (CD3) en las placas ateroscleróticas de los ratones diabéticos (**figura 22A**). La cuantificación de la tinción positiva mostró un menor número de células infiltrantes en las lesiones de los ratones tratados con el péptido NBD en comparación con los que recibieron vehículo (**figura 22, B y C**).



**Figura 22. El tratamiento con NBD reduce el contenido de leucocitos en las placas ateroscleróticas de ratones diabéticos.** (A) Imágenes representativas de la tinción de monocitos/macrófagos (ampliación x200) y células T (ampliación x400) en secciones del arco aórtico de ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos. Se marca la tinción positiva (flechas) y el lumen (L). Cuantificación de la tinción positiva para MOMA-2 (B) y CD3 (C). Media±EEM del total de animales por grupo (\*P<0.05 vs vehículo).



Se analizó también el contenido de colágeno (tinción con rojo picrosirio) y de CMLV (inmunofluorescencia de  $\alpha$ -actina), dos marcadores de estabilidad de la placa (**figura 23A**). Los ratones tratados con NBD presentaron placas menos inflamadas y más estables, como evidencia el incremento significativo en las proporciones relativas de colágeno/lípido y CMLV/macrófago (**figura 23B**).

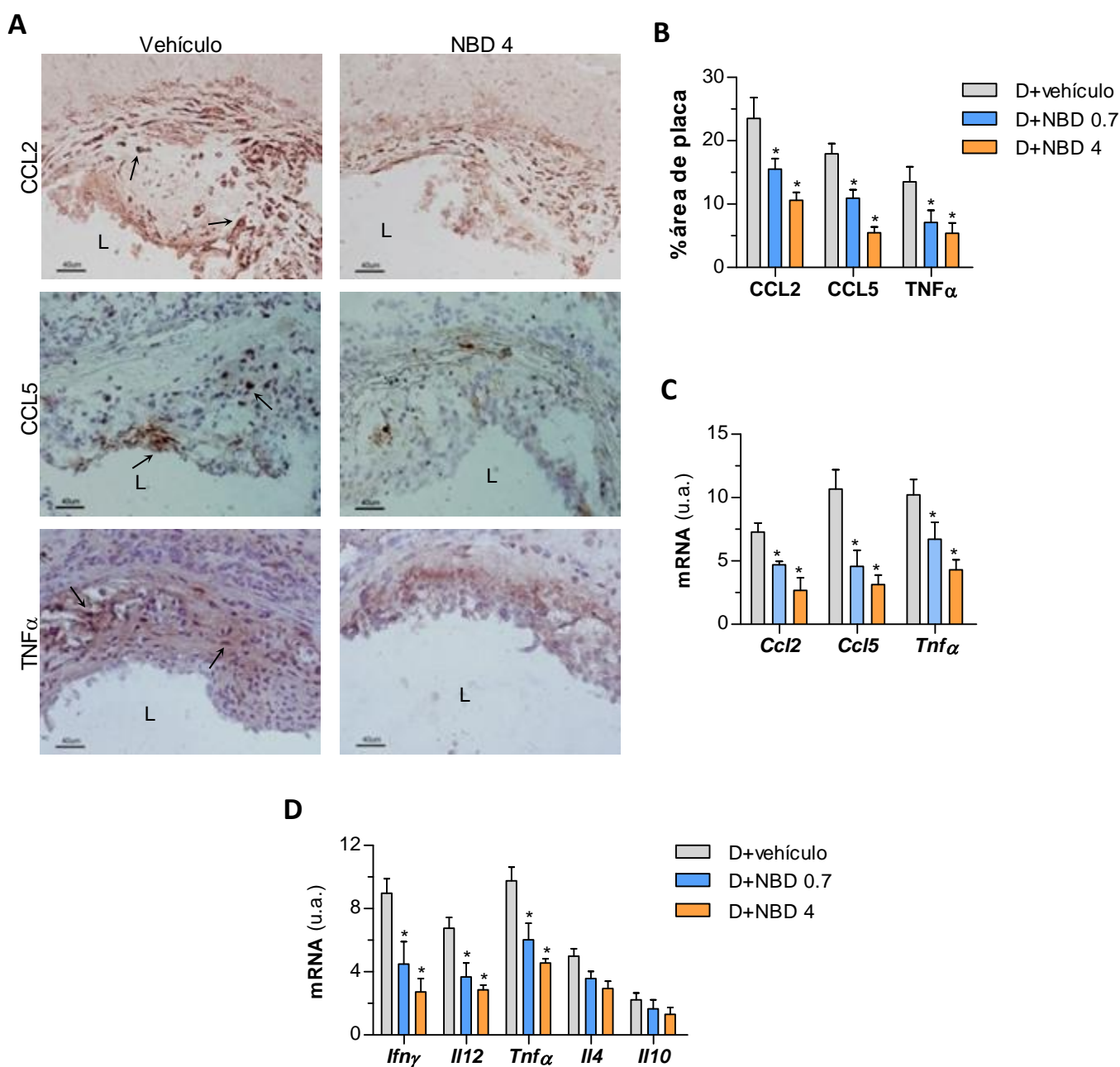


**Figura 23. El tratamiento con NBD aumenta la estabilidad de las placas ateroscleróticas. (A)** Las imágenes representativas de las tinciones de rojo picrosirio y  $\alpha$ -actina (ampliación x100 y x200; L, lumen) muestran mayor contenido de colágeno y CMLV en las lesiones ateroscleróticas (líneas punteadas) de ratones diabéticos tratados con NBD. **(B)** Relación colágeno/lípido (área rojo picrosirio/área Oil-red-O) y CMLV/macrófago (Mac) (área  $\alpha$ -actina/área MOMA-2) en los grupos de estudio. Media $\pm$ EEM del total de animales por grupo (\* $P$ <0.05 vs vehículo).

Entre las numerosas moléculas implicadas en el desarrollo de la aterosclerosis, estudiamos en las aortas de nuestro modelo experimental la expresión de CCL2, CCL5 y TNF $\alpha$ . Mediante inmunohistoquímica (**figura 24, A y B**) y PCR a tiempo real (**figura 24C**) comprobamos que el tratamiento de los ratones diabéticos con NBD redujo de forma dosis-dependiente y significativa la expresión proteica y génica de estos tres mediadores inflamatorios.

Por otro lado, y puesto que el bazo es la mayor fuente de citoquinas involucradas en la inflamación sistémica, analizamos en este órgano la expresión de genes representativos de las respuestas linfocitarias tipo Th1 y Th2. Los ratones tratados con NBD mostraron una menor expresión génica de citoquinas proinflamatorias Th1 (IFN $\gamma$ , IL-12 y TNF $\alpha$ ), pero no

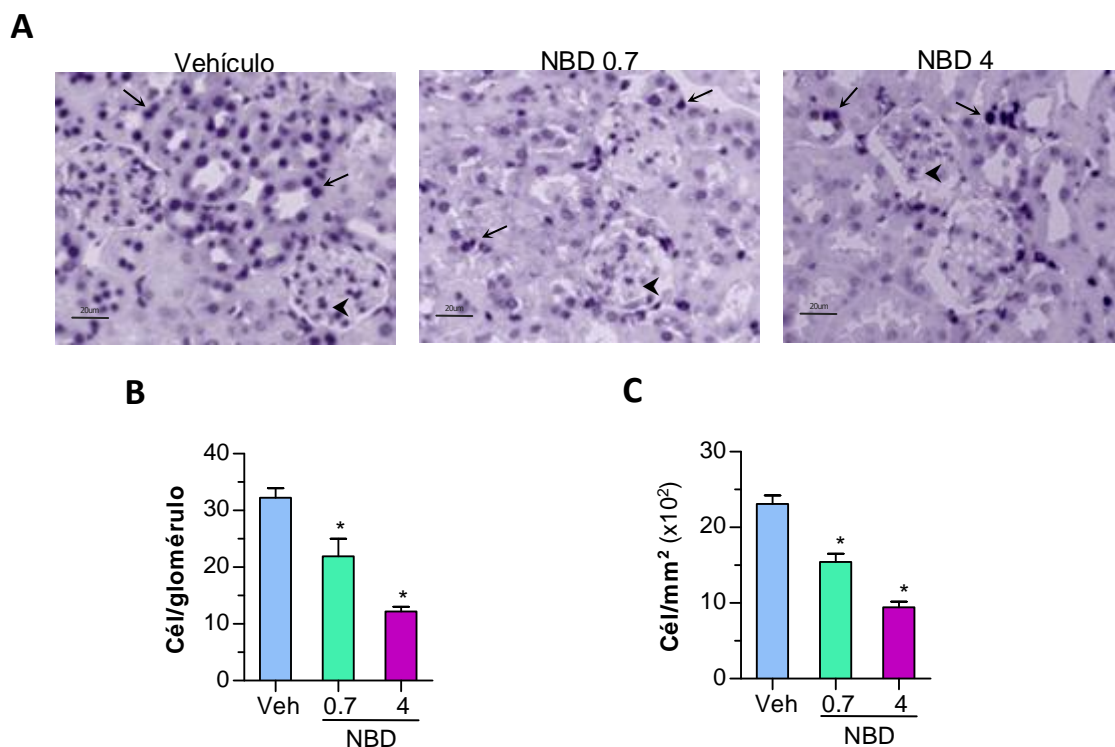
observamos diferencias significativas en los niveles de mRNA de citoquinas antiinflamatorias Th2 (IL-4, IL-10) (figura 24D).



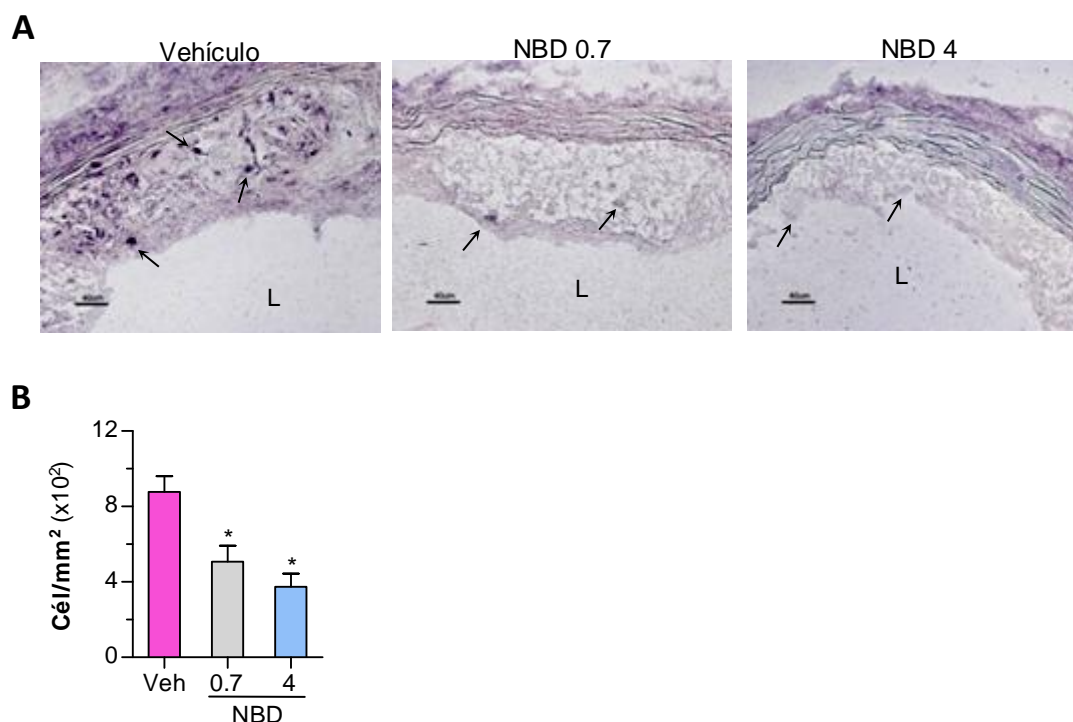
**Figura 24. El péptido NBD reduce la inflamación local y sistémica en los ratones diabéticos. (A)** Micrográficas representativas (aumento x200) de la inmunodetección de CCL2, CCL5 y TNF $\alpha$  en secciones aórticas de ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos a las 10 semanas de tratamiento. Se marca la tinción positiva (flechas) y el lumen (L). **(B)** Cuantificación de la tinción positiva en los tres grupos de estudio. **(C-D)** Análisis mediante PCR a tiempo real de los genes indicados en aorta **(C)** y bazo **(D)** de ratones diabéticos. Los valores normalizados por 18S se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Los resultados son media $\pm$ EEM del número total de animales por grupo (\*P<0.05 vs vehículo).

## 2.5. El tratamiento con el péptido inhibidor bloquea de manera efectiva la activación de NF- $\kappa$ B inducida por diabetes

Para comprobar la efectividad del péptido NBD como inhibidor *in vivo* de la vía NF- $\kappa$ B, analizamos la localización nuclear *in situ* de este factor de transcripción mediante inmunohistoquímica Southwestern. En los cortes renales de ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos, observamos una intensa tinción nuclear de NF- $\kappa$ B en las células del glomérulo y del túbulointersticio (**figura 25A**). Además, la cuantificación del número de células positivas demostró una reducción significativa en los grupos tratados con el péptido NBD (**figura 25, B y C**). De forma similar, se realizó la inmunohistoquímica Southwestern en cortes de aorta de los tres grupos diabéticos (**figura 26A**). La cuantificación del número de núcleos positivos concluyó que las lesiones ateroscleróticas de ratones tratados con NBD presentaban una menor activación de NF- $\kappa$ B en comparación con el grupo tratado con vehículo (**figura 26B**).



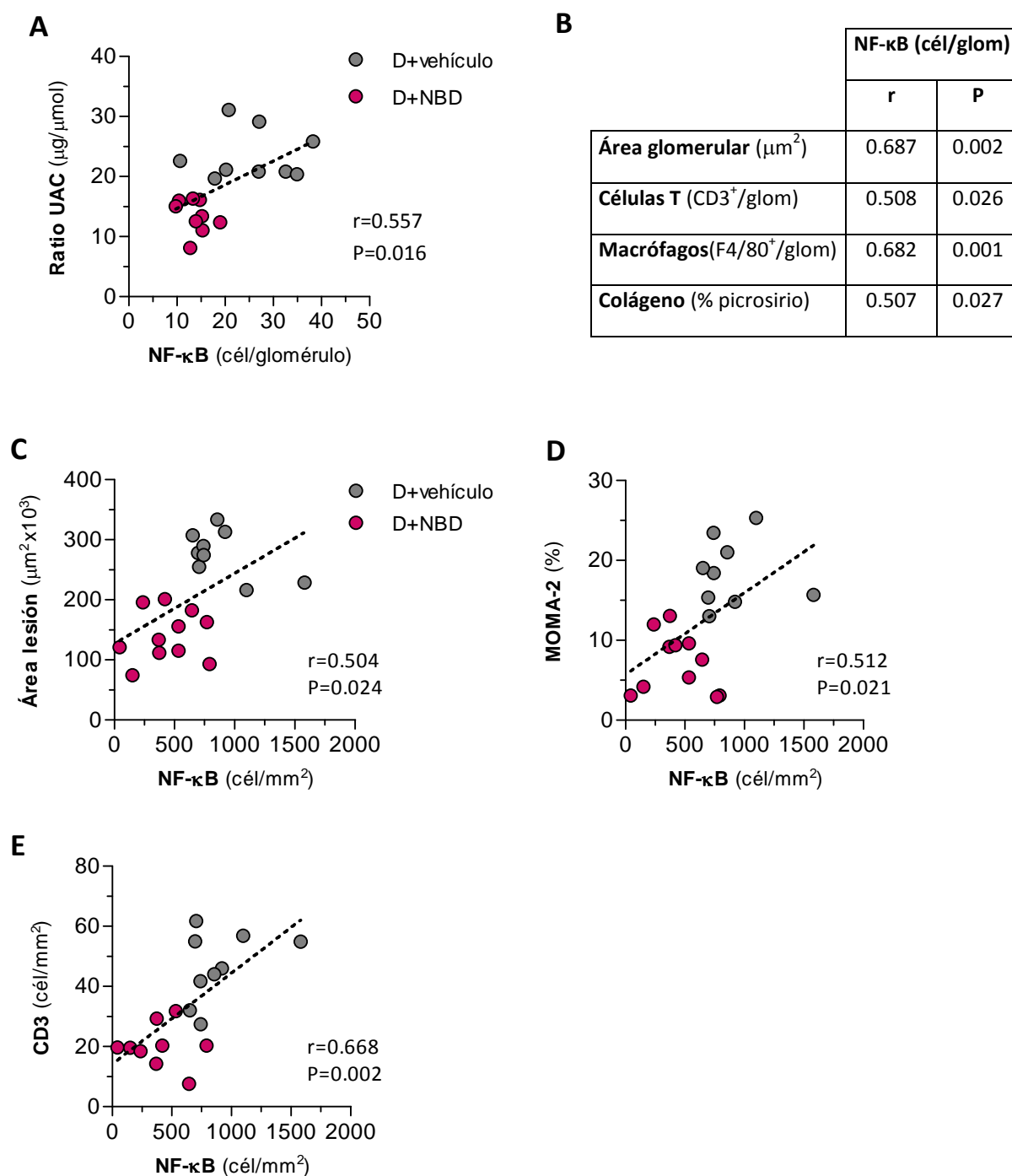
**Figura 25. El péptido NBD inhibe la activación renal de NF- $\kappa$ B en los ratones diabéticos. (A)** Imágenes representativas (aumento x200) de la inmunohistoquímica Southwestern *in situ* de NF- $\kappa$ B en cortes renales de ratones diabéticos después de 10 semanas de tratamiento. Se marcan núcleos positivos en glomérulo (punta de flecha) e intersticio (flecha). Análisis cuantitativo del número de células positivas glomerulares (**B**) y túbulointersticiales (**C**). Media±EEM de n=7-9 animales por grupo (\*P<0.05 vs vehículo).



**Figura 26. El péptido NBD inhibe la activación de NF-κB en las placas de ateroma. (A)** Imágenes representativas (aumento x200) de la inmunohistoquímica Southwestern *in situ* de NF-κB en secciones aórticas de ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos tratados con vehículo y dos dosis de péptido NBD. Se marca la tinción positiva (flechas) y el lumen (L). **(B)** Cuantificación del número de núcleos positivos en las lesiones. Media±EEM del número total de animales por grupo (\*P<0.05 vs vehículo).

En último lugar, el cálculo del coeficiente de Pearson en el modelo experimental de diabetes mostró una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la tinción nuclear de NF-κB en riñón y algunos parámetros indicativos de daño renal, como la proporción albúmina/creatinina en orina, el área glomerular, el infiltrado leucocitario y la fibrosis (**figura 27, A y B**). Del mismo modo, la actividad NF-κB en aorta mostró una correlación positiva con el tamaño de las placas de ateroma (**figura 27C**) y su contenido en monocitos/macrófagos (**figura 27D**) y linfocitos T (**figura 27E**). Por lo tanto, a la vista de estos resultados, podríamos concluir que la activación de NF-κB es un buen marcador indicativo del daño y la inflamación renal y vascular en los ratones diabéticos.





**Figura 27. Correlación de los valores de NF- $\kappa$ B activado con parámetros indicativos de daño renal y vascular en los ratones diabéticos. (A)** Recta de regresión entre la tinción renal de NF- $\kappa$ B y la relación albúmina/creatinina en orina. **(B)** Resumen de los valores de coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y la significación ( $P$ ) para otras variables de daño renal. **(C-E)** Análisis de regresión de la tinción de NF- $\kappa$ B en aorta con el área de la lesión aterosclerótica **(C)** y el contenido de macrófagos **(D)** y linfocitos T **(E)** en las lesiones.

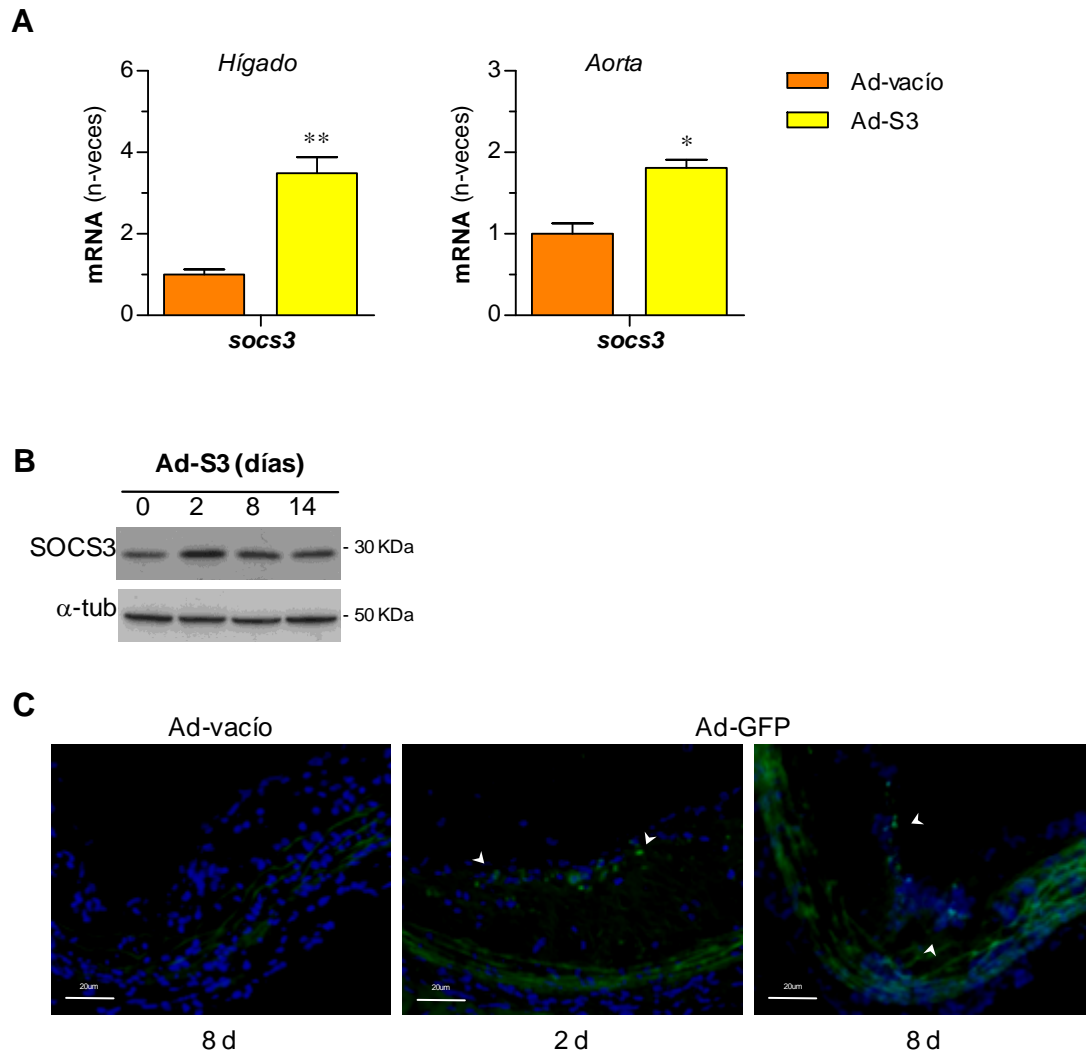
## PARTE II: INHIBICIÓN CONSTITUTIVA DE LA VÍA JAK/STAT EN LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL MEDIANTE TERAPIA GÉNICA CON SOCS3

La activación crónica de la vía JAK/STAT contribuye a la inflamación vascular durante la aterosclerosis a través de la inducción de genes clave en el reclutamiento de leucocitos, la migración y proliferación de CMLV, la apoptosis y la formación de células espumosas. Estudios funcionales en modelos animales han demostrado el importante papel de la familia de reguladores endógenos SOCS (principalmente SOCS1 y SOCS3) en el control de la respuesta inflamatoria mediada por JAK/STAT durante el daño vascular. Basados en la hipótesis de que la modulación de proteínas SOCS es una potencial estrategia terapéutica en enfermedades inflamatorias, en nuestro laboratorio desarrollamos un vector de expresión del gen SOCS3 para su aplicación en terapia génica experimental. Nuestro objetivo fue investigar las propiedades antiinflamatorias y ateroprotectoras de un adenovirus que codifica la proteína SOCS3, tanto *in vivo* (modelo murino de aterosclerosis) como *in vitro* (células vasculares y macrófagos en condiciones inflamatorias).

### 1. ACCIONES *IN VIVO* DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ADENOVIRUS SOCS3 EN LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL

#### 1.1. Transferencia del gen SOCS3 en ratones ateroscleróticos

Seleccionamos un vector adenoviral de primera generación (Ad5 con delección de la región E1) por su alta eficacia de transducción, amplio tropismo y fácil producción. Para evaluar *in vivo* la eficiencia de la transferencia génica en ratones apoE<sup>-/-</sup>, se inyectó una dosis (1-2 x 10<sup>10</sup> pfu) de adenovirus codificante para SOCS3 (Ad-S3), empleando como controles el adenovirus para la proteína fluorescente GFP (Ad-GFP) y el vector sin la expresión del gen de interés (Ad-vacío). El análisis mediante PCR mostró un aumento de la expresión del transgen SOCS3 mayoritariamente en el hígado, pero también en el tejido aórtico de los ratones inyectados con Ad-S3 en comparación con el grupo Ad-vacío (**figura 28A**). Observamos también un incremento gradual de la proteína SOCS3 en el tejido aórtico, que se mantuvo elevada incluso 14 días después de la infección (**figura 28B**). Además, mediante microscopía se detectó una intensa fluorescencia verde en las placas aórticas de los ratones transfectados con Ad-GFP, predominantemente en las áreas ricas en macrófagos (**figura 28C**).

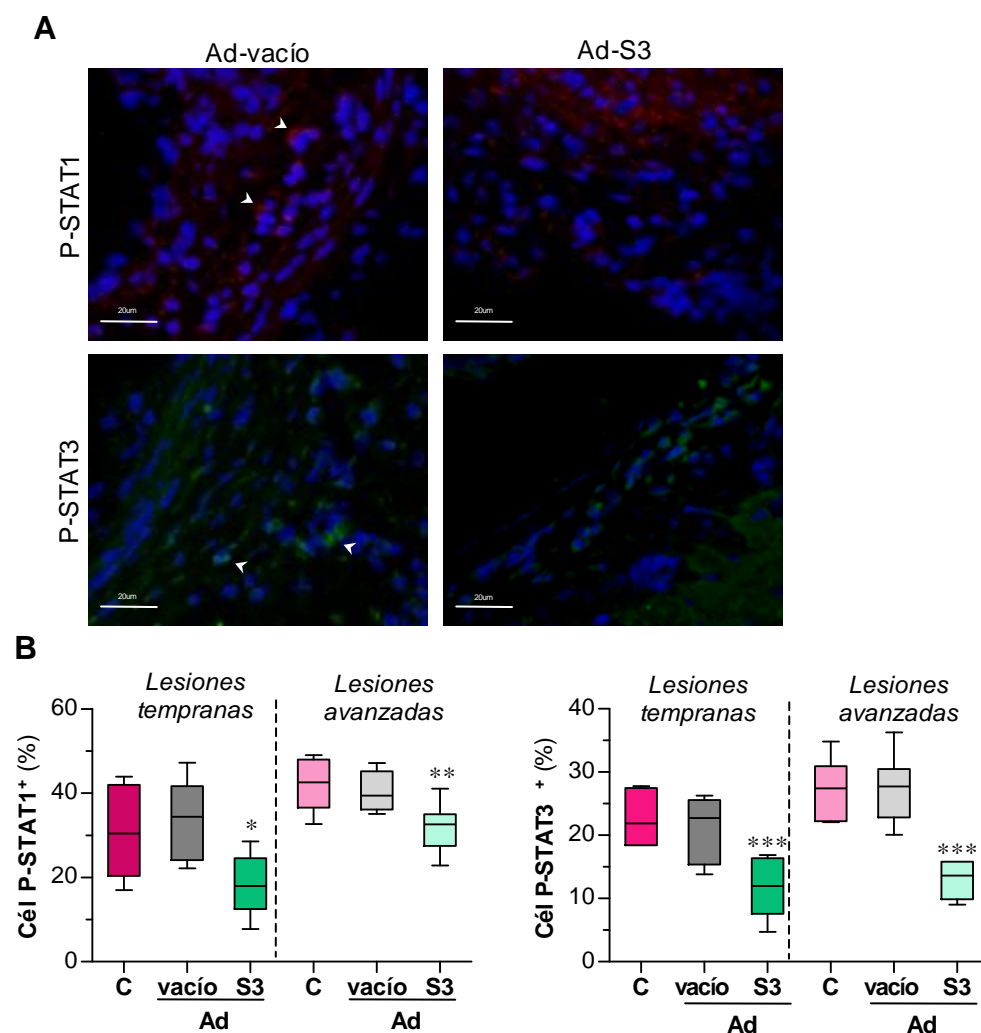


**Figura 28. Eficiencia de la transferencia génica en ratones ateroscleróticos. (A)** Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión de SOCS3 en hígado y aorta de ratones  $\text{apoE}^{-/-}$  a los 8 días de la inyección de los vectores Ad-vacío y Ad-S3. Los valores normalizados con la expresión de 18S se expresan en incremento vs Ad-vacío (n-veces). Media $\pm$ EEM (n=3 ratones/grupo). \* $P<0.05$  y \*\* $P<0.01$  vs Ad-vacío. **(B)** Evolución con el tiempo de la expresión proteica de SOCS3 en aortas de ratones inyectados con Ad-S3. Gel representativo de 2 experimentos. **(C)** Imágenes representativas (n=2 experimentos) de la expresión proteica de GFP (verde, las flechas indican células positivas; azul, tinción nuclear con DAPI) en secciones aórticas de ratones inyectados con Ad-GFP.

## 1.2. La administración del gen SOCS3 inhibe la activación de STAT y reduce la aterosclerosis en el modelo experimental

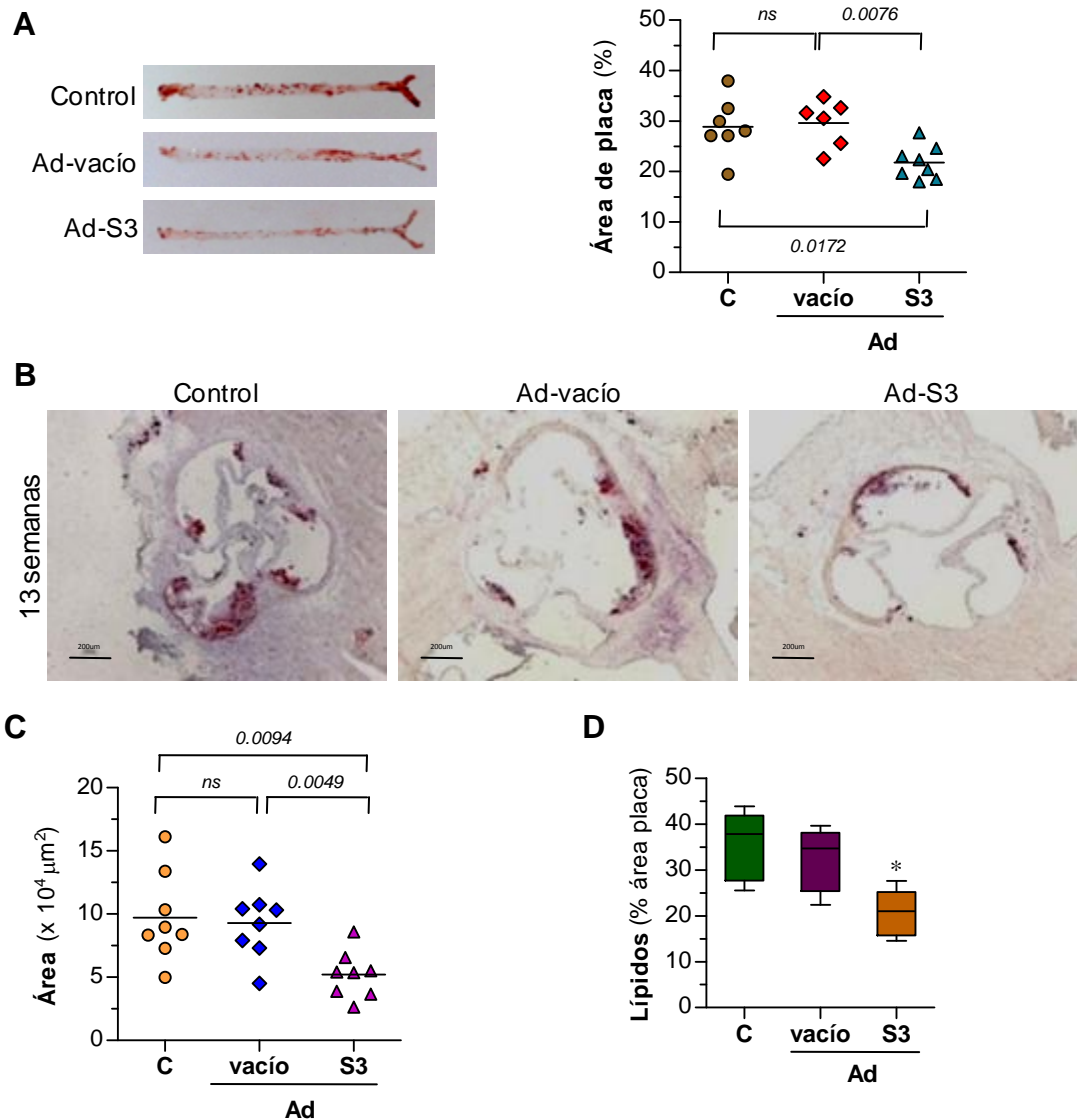
El impacto de la administración del gen SOCS3 en el inicio y la progresión de la placa aterosclerótica se exploró en ratones  $\text{apoE}^{-/-}$  de 8 semanas (modelo de lesiones tempranas) y 28 semanas (modelo de lesiones avanzadas) de edad, que recibieron una inyección intravenosa de adenovirus (Ad-vacio o Ad-S3) y se alimentaron durante 5 semanas con dieta

hiperlipídica. Se incluyó también un grupo de ratones control de la misma edad sin tratamiento. El análisis mediante inmunofluorescencia demostró una reducción significativa de la activación de STAT (medida por la fosforilación en tirosina de STAT1 y STAT3) en las lesiones ateroscleróticas tempranas y avanzadas de los ratones tratados con Ad-S3, en comparación con sus respectivos grupos tratados con Ad-vacío (**figura 29**).



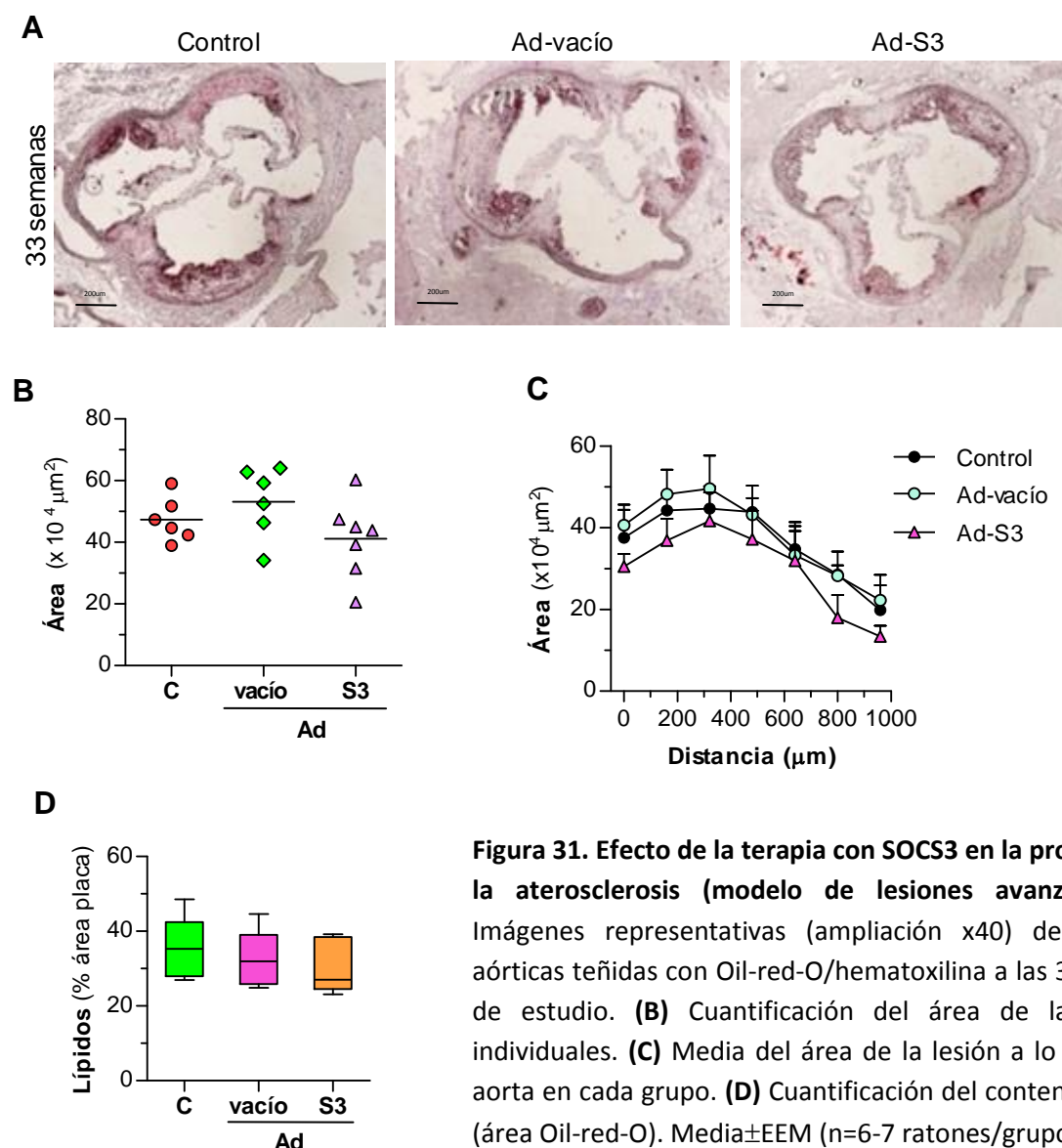
**Figura 29. La administración del gen SOCS3 inhibe la activación de STAT en las lesiones ateroscleróticas. (A)** Imágenes representativas (ampliación x400) de la inmunofluorescencia de proteínas STAT fosforiladas (rojo, P-STAT1; verde, P-STAT3; azul, tinción nuclear con DAPI) en secciones aórticas de ratones apoE<sup>-/-</sup> (modelo de lesiones tempranas). Las flechas indican células positivas. **(B)** Diagrama de cajas de la cuantificación de células positivas en lesiones tempranas (13 semanas; n=8-9 ratones por grupo) y avanzadas (33 semanas; n=6-7 ratones por grupo) de ratones control sin tratamiento (C) o tratados con Ad-vacío y Ad-S3. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 vs Ad-vacío.

Para cuantificar la aterosclerosis se midió el área de la lesión aterosclerótica en la aorta completa (*en face*) y en cortes seriados de la raíz aórtica. En el modelo de lesiones tempranas, la transferencia del gen SOCS3 redujo significativamente la formación de placas de ateroma a lo largo de la aorta (**figura 30A**), así como el tamaño de las lesiones (% disminución vs Ad-vacío:  $27 \pm 4$ ; **figura 30, B y C**) y su contenido en lípidos (**figura 30D**).



**Figura 30. Efecto de la terapia génica con SOCS3 en el desarrollo de aterosclerosis (modelo de lesiones tempranas).** (A) Imágenes representativas de la tinción de la aorta *en face* con Sudan IV y cuantificación del tamaño de placas a las 13 semanas de estudio (n=6-8 ratones/grupo). (B-C) Imágenes representativas (ampliación x40) de secciones del arco aórtico teñidas con Oil-red-O/hematoxilina (B) y cuantificación del área de la lesión (C). En (A) y (C) se representan los datos individuales, el valor medio de cada grupo (línea horizontal) y la significación (valor de P; ns, no significativo). (D) Cuantificación del contenido lipídico (área Oil-red-O) en secciones aórticas. Media $\pm$ EEM (n=8 ratones/grupo). \*P<0.05 vs Ad-vacío.

Al contrario de lo observado en el modelo de lesiones tempranas, el análisis de las lesiones avanzadas no produjo diferencias significativas entre los grupos Ad-S3, Ad-vacío y control en cuanto a los valores de tamaño, extensión y contenido lipídico de las placas (**figura 31**), lo que sugiere que la terapia génica con SOCS3 no es capaz de frenar la progresión de la aterosclerosis en el modelo experimental.



**Figura 31. Efecto de la terapia con SOCS3 en la progresión de la aterosclerosis (modelo de lesiones avanzadas).** (A) Imágenes representativas (ampliación x40) de secciones aórticas teñidas con Oil-red-O/hematoxilina a las 33 semanas de estudio. (B) Cuantificación del área de las lesiones individuales. (C) Media del área de la lesión a lo largo de la aorta en cada grupo. (D) Cuantificación del contenido lipídico (área Oil-red-O). Media $\pm$ EEM (n=6-7 ratones/grupo). No hubo diferencias significativas entre los grupos.

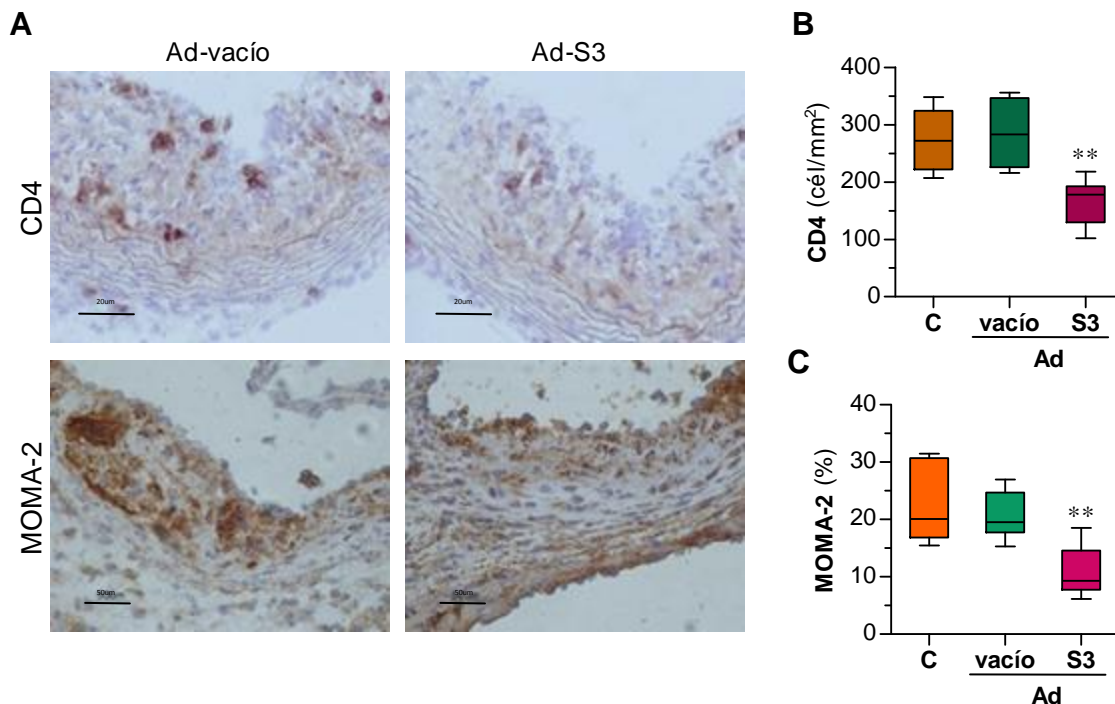
Por otra parte, en ambos modelos (lesiones tempranas y avanzadas) no observamos cambios significativos entre las lesiones de los grupos control (no tratado) y Ad-vacío, indicando que la infección adenoviral *per se* no afectó a la aterosclerosis. Tampoco se detectaron variaciones en el peso corporal ni en el perfil lipídico entre los distintos grupos de cada modelo experimental (**tabla 9**).

|                            | LESIONES TEMPRANAS<br>(13 semanas) |                   |                | LESIONES AVANZADAS<br>(33 semanas) |                   |                |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------|----------------|------------------------------------|-------------------|----------------|
|                            | Control<br>(n=8)                   | Ad-vacío<br>(n=8) | Ad-S3<br>(n=8) | Control<br>(n=6)                   | Ad-vacío<br>(n=6) | Ad-S3<br>(n=7) |
| <b>Peso corporal (g)</b>   | 22±2                               | 22±3              | 23±2           | 32±4                               | 33±5              | 34±3           |
| <b>Colesterol (mmol/L)</b> | 9.3±0.8                            | 9.3±0.8           | 9.2±0.3        | 17.5±1.3                           | 16.8±1.7          | 15.9±0.9       |
| <b>LDL (mmol/L)</b>        | 8.5±0.7                            | 7.9±0.6           | 8.8±0.5        | 16.1±1.4                           | 15.1±1.8          | 15.3±1.0       |
| <b>HDL (mmol/L)</b>        | 0.38±0.02                          | 0.34±0.04         | 0.26±0.02      | 0.41±0.03                          | 0.42±0.06         | 0.31±0.02      |
| <b>TG (mmol/L)</b>         | 1.0±0.1                            | 1.3±0.1           | 0.9±0.1        | 1.1±0.1                            | 1.2±0.2           | 1.1±0.2        |

**Tabla 9. Peso corporal y perfil lipídico de los ratones apoE<sup>-/-</sup>.** Los valores son media±EEM del número de animales de cada grupo. No hubo diferencias significativas entre los grupos de cada modelo.

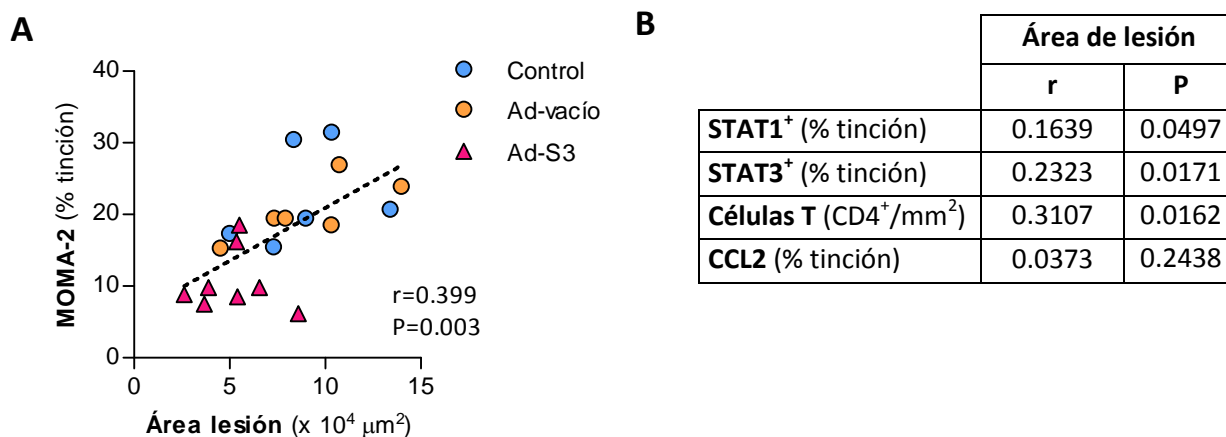
### 1.3. Alteraciones en la composición de la placa aterosclerótica de los ratones tratados con adenovirus SOCS3

La evaluación histológica de las lesiones tempranas demostró una reducción significativa de linfocitos T (CD4) y macrófagos (MOMA-2) en el grupo Ad-S3 en comparación con el control y Ad-vacío (**figura 32**). Además, el análisis de regresión y el cálculo del coeficiente de Pearson mostró una correlación positiva entre el área de la lesión y la tinción positiva de STAT1, STAT3, CD4, MOMA-2 y CCL2 en los grupos experimentales (**figura 33**), indicando un mayor contenido inflamatorio en las lesiones más grandes.



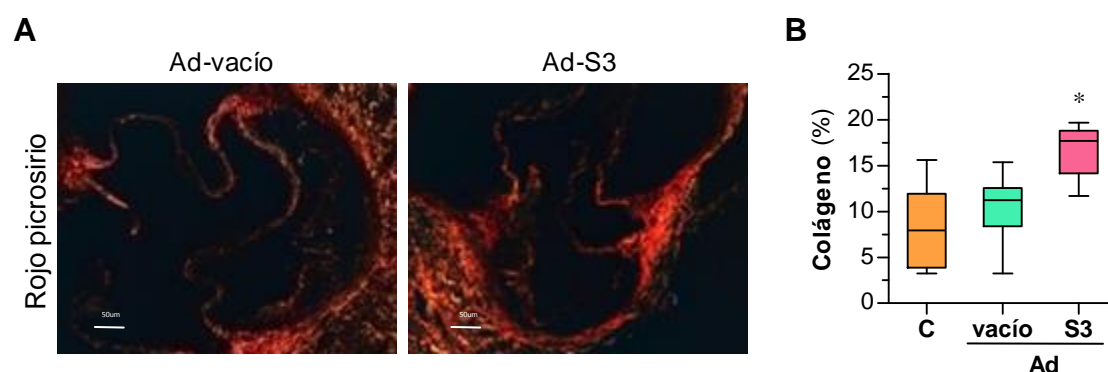


**Figura 32 (página anterior). Cambios en la composición de la placa aterosclerótica producidos por la administración del gen SOCS3. (A)** Imágenes representativas de la tinción inmunoperoxidasa de CD4 (ampliación x400) y MOMA-2 (ampliación x200) en secciones aórticas de ratones del modelo de lesiones tempranas. Análisis cuantitativo del contenido de linfocitos T **(B)** y macrófagos **(C)** en las lesiones. Media $\pm$ EEM (n=8 ratones/grupo). \*\*P<0.01 vs Ad-vacío.



**Figura 33. Correlación entre parámetros de las lesiones del modelo temprano. (A)** Recta de regresión entre el área de la lesión y el contenido de macrófagos. **(B)** Resumen del coeficiente de correlación (r) y la significación (P) calculados para otras variables.

En paralelo al componente inflamatorio, analizamos en las lesiones ateroscleróticas la distribución de colágeno como indicador de estabilidad. El análisis de la tinción con rojo picosirio (**figura 34**) demostró que la administración del adenovirus de SOCS3 promueve un fenotipo de la placa más estable, caracterizado por un incremento en el contenido de colágeno y mayor proporción relativa colágeno/lípido (área rojo picosirio/área Oil-red-O: Ad-vacío, 0.39 $\pm$ 0.05; Ad-S3, 0.86 $\pm$ 0.08, P<0.05; no mostrado).

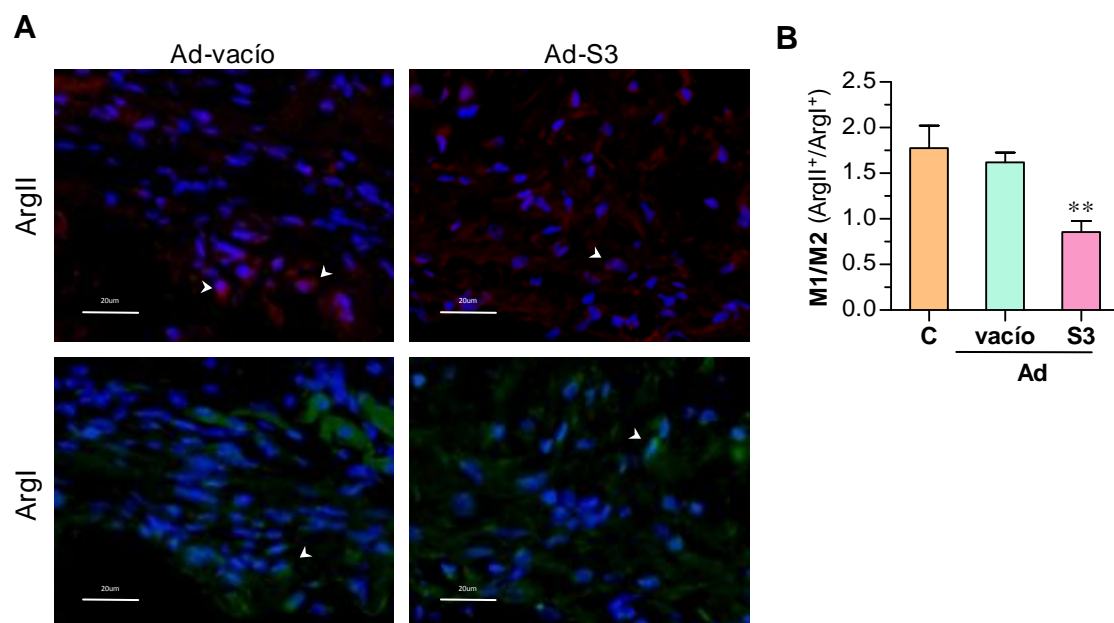


**Figura 34. La terapia génica con SOCS3 favorece la estabilidad de las placas ateroscleróticas. (A)** Imágenes representativas (aumento x200) de la tinción con rojo picosirio en secciones aórticas de ratones (modelo de lesiones tempranas). **(B)** Cuantificación del contenido de colágeno en las lesiones. Media $\pm$ EEM (n=8 ratones/grupo). \*P<0.05 vs Ad-vacío.



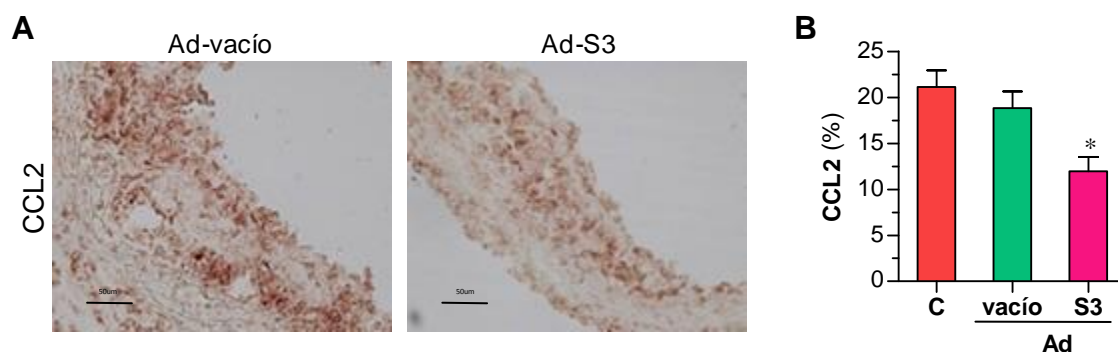
#### 1.4. La sobre-expresión de SOCS3 reduce la inflamación vascular y sistémica en los ratones ateroscleróticos

Una vez comprobado que SOCS3 reduce la acumulación de macrófagos intraplaca, examinamos la distribución fenotípica de estas células en las lesiones, empleando como marcadores las isoformas ArgII (fenotipo clásico de macrófagos proinflamatorios M1) y ArgI (fenotipo alternativo de macrófagos antiinflamatorios M2). El análisis mediante inmunofluorescencia mostró una expresión mayoritaria de ArgII (M1) en las lesiones de los grupos control y Ad-vacío, mientras que ArgI (M2) fue el marcador predominante en el grupo Ad-S3 (**figura 35A**). Como consecuencia, la relación M1/M2 se redujo significativamente en el grupo Ad-S3 con respecto a los controles (**figura 35B**).



**Figura 35. La terapia génica con SOCS3 reduce el fenotipo de macrófagos inflamatorios en las placas ateroscleróticas. (A)** Imágenes representativas (ampliación x400) de la inmunofluorescencia de macrófagos M1 (ArgII) y M2 (ArgI) en secciones aórticas (modelo de lesiones tempranas). Las flechas indican células positivas. **(B)** Cuantificación de la proporción relativa de ambos tipos celulares. Media±EEM (n=8 ratones/grupo). \*\*P<0.01 vs Ad-vacío.

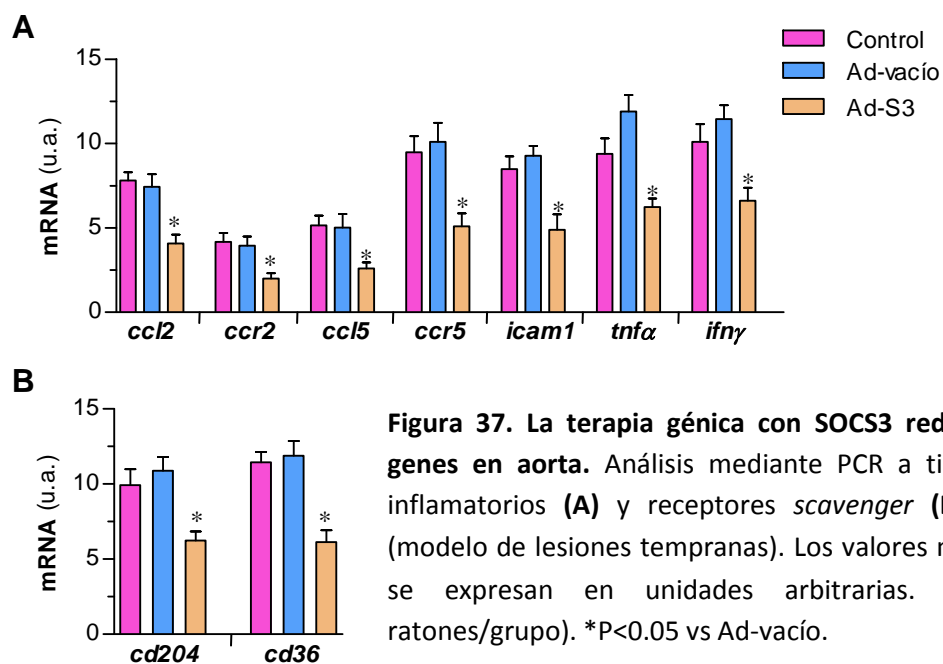
Quisimos estudiar también la expresión de la quimioquina CCL2, uno de los principales mediadores implicados en el reclutamiento de monocitos circulantes hacia el interior de la placa de ateroma. Como se observa en la **figura 36**, la administración del adenovirus SOCS3 redujo significativamente los niveles proteicos de CCL2 en las lesiones ateroscleróticas.



**Figura 36. La terapia génica con SOCS3 reduce la expresión de CCL2 en las lesiones ateroscleróticas.**

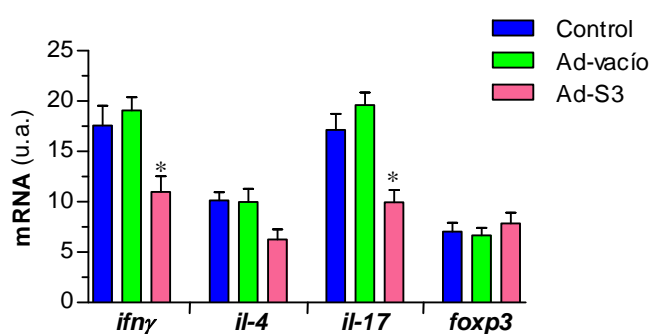
**(A)** Imágenes representativas (ampliación x200) de la tinción inmunoperoxidasa de CCL2 en secciones aórticas del modelo de lesiones tempranas. **(B)** Cuantificación de la tinción positiva. Media±EEM (n=8 ratones/grupo). \*P<0.05 vs Ad-vacío.

A continuación exploramos si la ateroprotección mediada por SOCS3 se asociaba con alteraciones en la expresión de genes dependientes de la vía JAK/STAT. El análisis mediante PCR cuantitativa en tejido aórtico mostró una disminución significativa de la expresión de mRNA de quimioquinas y sus receptores (CCL2/CCR2 y CCL5/CCR5), moléculas de adhesión (ICAM-1) y citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) en los ratones del grupo Ad-S3 (**figura 37A**). Asimismo, la terapia génica con SOCS3 redujo la expresión de CD204 y CD36, dos receptores *scavenger* implicados en la internalización de LDL modificadas y la formación de células espumosas (**figura 37B**).



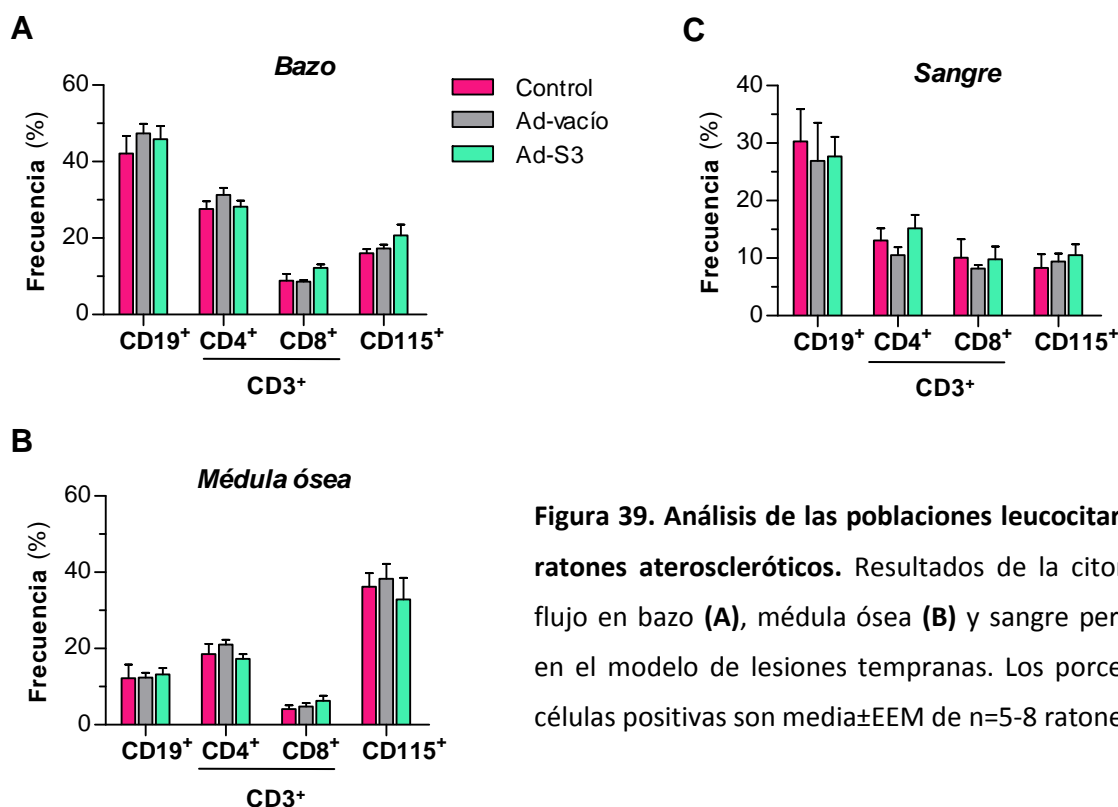
**Figura 37. La terapia génica con SOCS3 reduce la expresión de genes en aorta.** Análisis mediante PCR a tiempo real de genes inflamatorios **(A)** y receptores *scavenger* **(B)** en tejido aórtico (modelo de lesiones tempranas). Los valores normalizados con 18S se expresan en unidades arbitrarias. Media±EEM (n=5-8 ratones/grupo). \*P<0.05 vs Ad-vacío.

En último lugar se estudió el impacto de la terapia génica con SOCS3 en la inflamación sistémica, determinando los niveles de citoquinas y las diferentes poblaciones leucocitarias en el modelo de lesiones tempranas. Como se muestra en la **figura 38**, la administración del adenovirus SOCS3 redujo la expresión en bazo de citoquinas características de respuesta Th1 (IFN $\gamma$ ) y Th17 (IL-17), pero no modificó la expresión de genes de respuesta Th2 (IL-4) y Treg (factor de transcripción Foxp3).



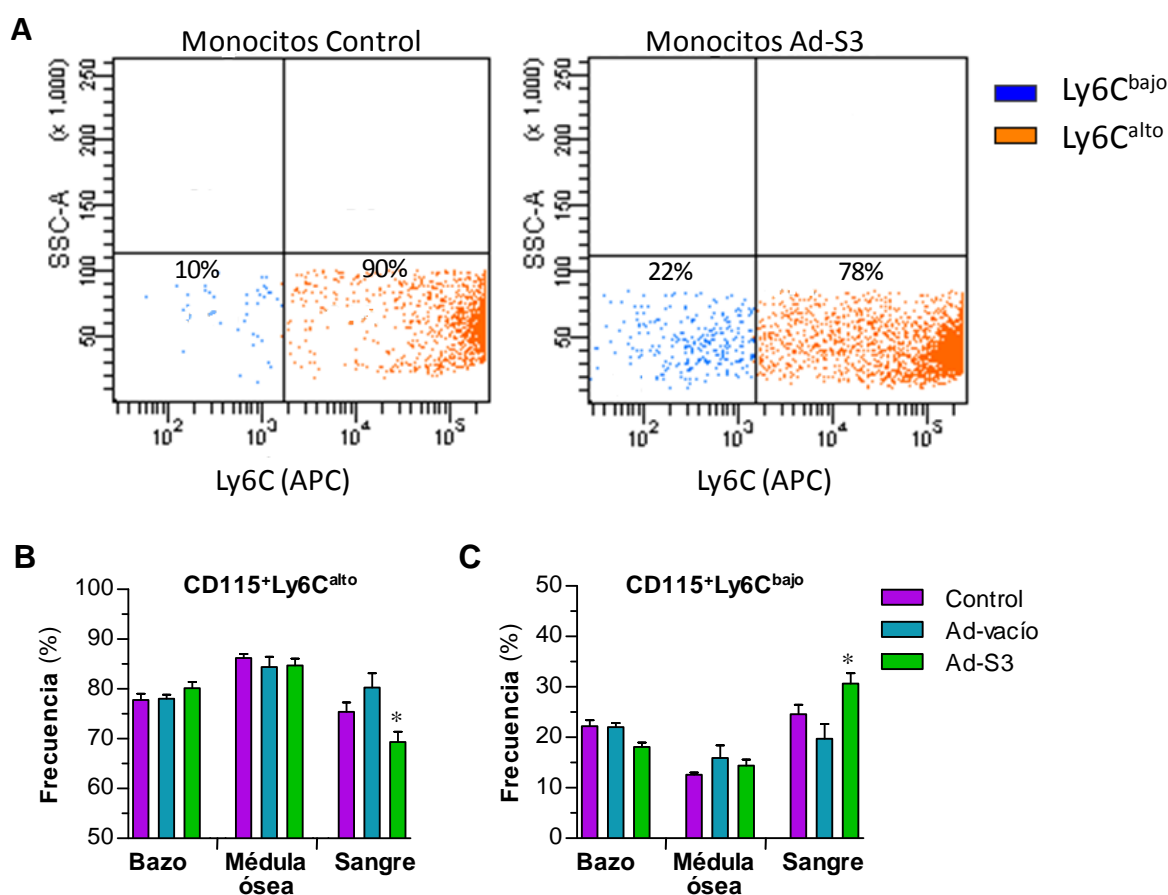
**Figura 38. Efecto de SOCS3 en la inflamación sistémica.** Análisis mediante PCR a tiempo real de genes de respuesta Th1, Th2, Th17 y Treg en el bazo de ratones apoE<sup>-/-</sup>. Media $\pm$ EEM (n=5-8 ratones/grupo). \*P<0.05 vs Ad-vacío.

El efecto de la administración de SOCS3 en las poblaciones celulares de bazo, médula ósea y sangre se examinó mediante citometría de flujo. No encontramos diferencias significativas en el número de células B (CD19), células T (CD3 y subtipos CD4 y CD8) y monocitos (CD115) entre los grupos control, Ad-vacío y Ad-S3 (**figura 39**).



**Figura 39. Análisis de las poblaciones leucocitarias en los ratones ateroscleróticos.** Resultados de la citometría de flujo en bazo (A), médula ósea (B) y sangre periférica (C) en el modelo de lesiones tempranas. Los porcentajes de células positivas son media $\pm$ EEM de n=5-8 ratones/grupo.

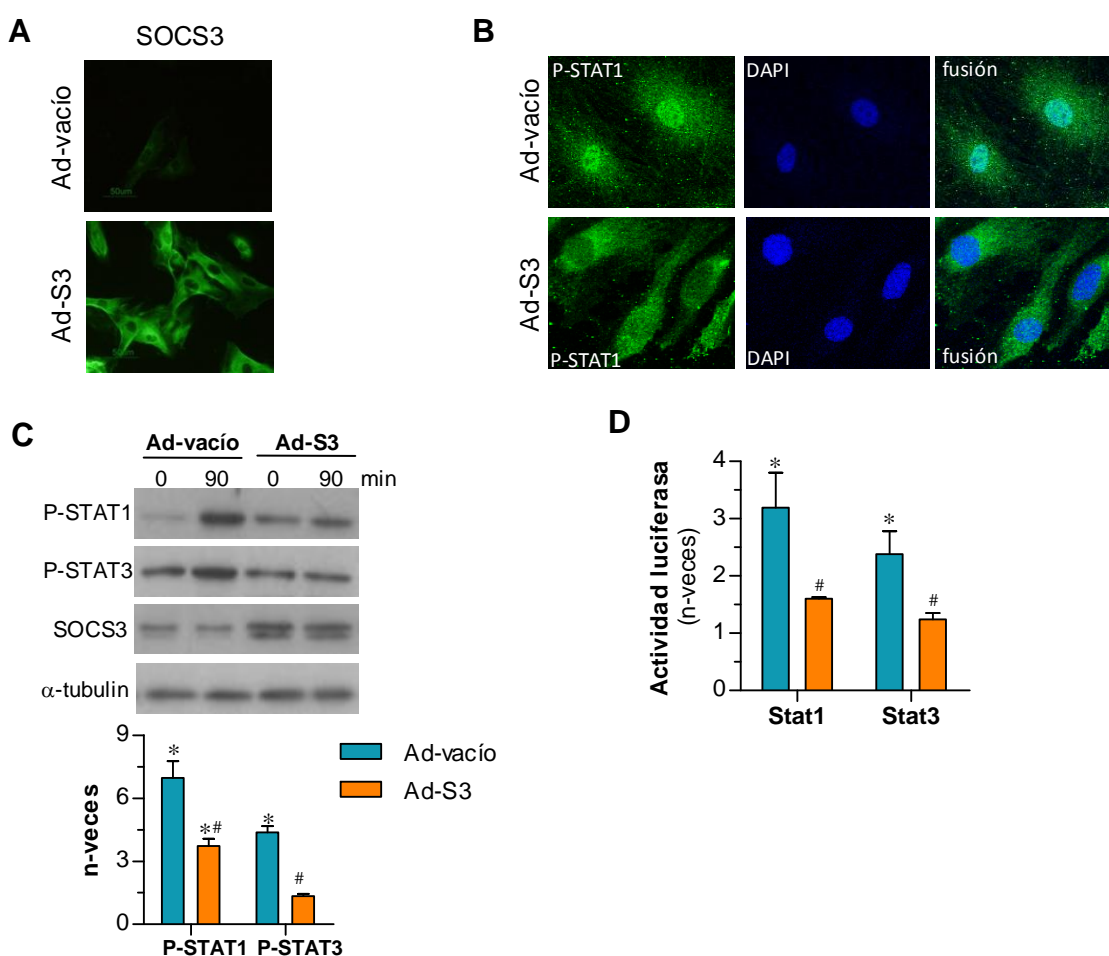
También evaluamos las subpoblaciones de monocitos empleando el marcador Ly6C para diferenciar entre monocitos  $CD115^{+}Ly6C^{alto}$  (más activados y proinflamatorios) y  $CD115^{+}Ly6C^{bajo}$  (menos activados). En comparación con los controles, los ratones del grupo Ad-S3 mostraron una menor frecuencia de monocitos  $CD115^{+}Ly6C^{alto}$  y un aumento del tipo  $CD115^{+}Ly6C^{bajo}$  (**figura 40**). Sin embargo, esta tendencia solo fue significativa en sangre periférica, lo que indica que la administración del gen SOCS3 reduce el estado de activación de los monocitos circulantes.



**Figura 40. Estudio de las subpoblaciones de monocitos en ratones ateroscleróticos. (A)** Análisis representativo de la citometría de flujo en sangre de ratones  $apoE^{-/-}$  (grupos control y Ad-S3; modelo de lesiones tempranas) en el que se muestra la distribución de las poblaciones de monocitos  $CD115^{+}$  marcados con Ly6C. Resumen de las proporciones de monocitos  $CD115^{+}Ly6C^{alto}$  (**B**) y  $CD115^{+}Ly6C^{bajo}$  (**C**) en muestras de bazo, médula ósea y sangre periférica de los ratones. Los porcentajes de células positivas son media $\pm$ EEM de  $n=5-8$  ratones/grupo. \* $P<0.05$  vs Ad-vacío.

## 2. ACCIONES *IN VITRO* DEL ADENOVIRUS SOCS3

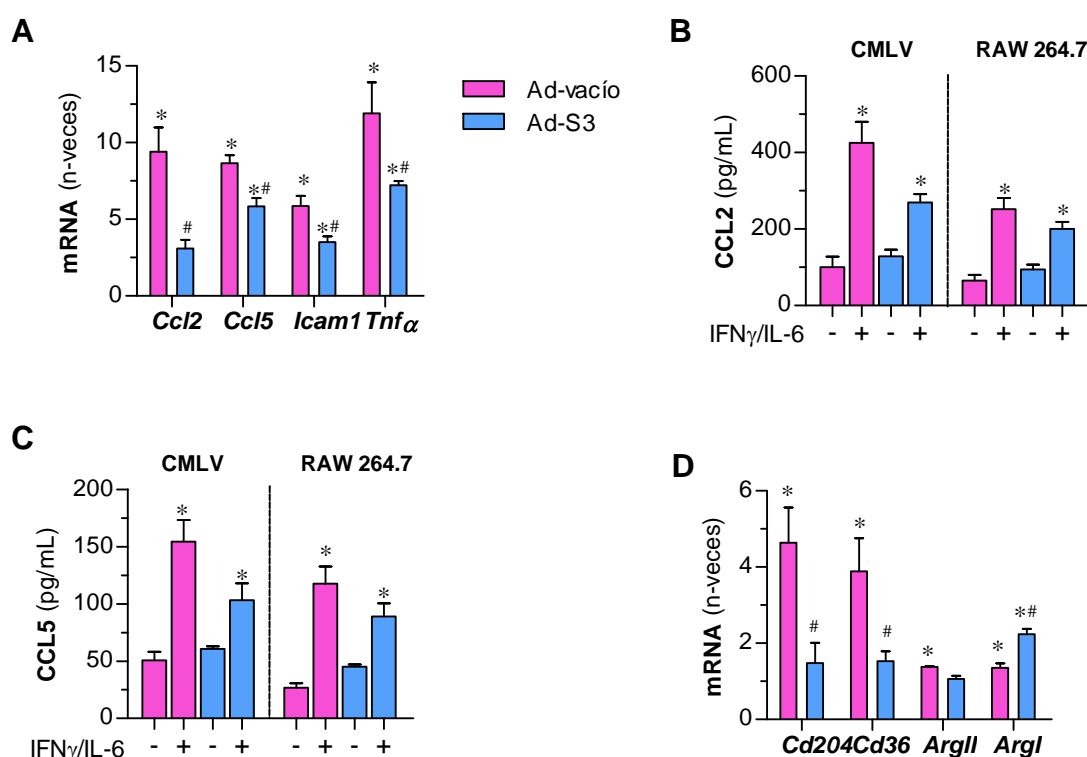
Los efectos *in vitro* de la inducción de SOCS3 mediada por adenovirus se analizaron en CMLV y macrófagos, dos constituyentes celulares que participan activamente en el desarrollo de la placa de ateroma. Los estudios de inmunofluorescencia (**figura 41, A y B**) y Western blot (**figura 41C**) en CMLV infectadas con Ad-S3 demostraron que el aumento de la síntesis proteica de SOCS3 previene la fosforilación y translocación nuclear de STAT1 y STAT3 inducida por las citoquinas IFN $\gamma$  e IL-6. De manera similar, los ensayos de gen reportero en macrófagos RAW 264.7 mostraron que SOCS3 suprime la actividad transcripcional de STAT1 y STAT3 inducida por citoquinas (**figura 41D**).



**Figura 41. Efectos *in vitro* de la inducción de SOCS3.** (A) Inmunofluorescencia de SOCS3 en CMLV infectadas con Ad-vacío y Ad-S3. (B) Distribución de P-STAT1 en CMLV a los 60 minutos de estimulación ( $10^3$  U/mL IFN $\gamma$  y  $10^2$  U/mL IL-6). Se observa ausencia de tinción nuclear verde en las células infectadas con Ad-S3. Imágenes representativas (n= 3 experimentos). (C) Análisis por Western blot de P-STAT1, P-STAT3 y SOCS3 en CMLV estimuladas con citoquinas. (D) Ensayo de gen reportero para STAT1 y STAT3 en macrófagos RAW 264.7 a las 16 horas de estimulación. Los valores se expresan como incremento vs basal y son media $\pm$ EEM de 4-6 experimentos. \*P<0.05 vs basal; #P<0.05 vs Ad-vacío.

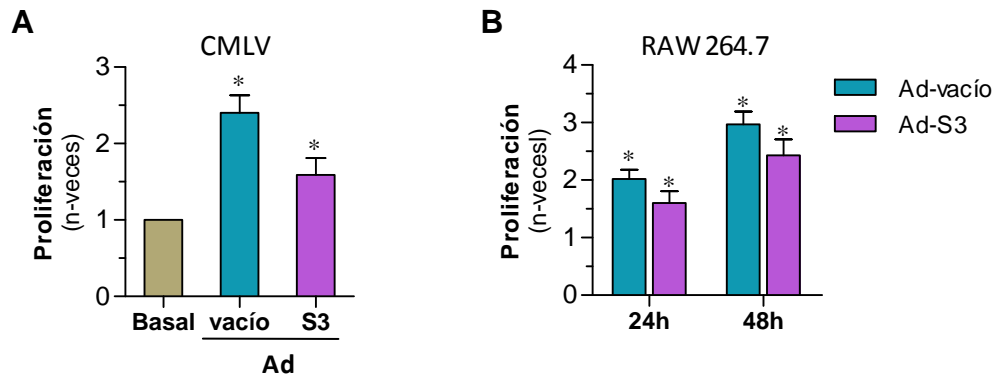
A continuación evaluamos el efecto de la transfección de SOCS3 en la expresión de genes dependientes de JAK/STAT inducidos por la estimulación con citoquinas. El análisis por PCR cuantitativa mostró un marcado descenso en los niveles de mRNA de mediadores inflamatorios (CCL2, CCL5, ICAM-1 y TNF $\alpha$ ) en las CMLV tratadas con Ad-S3 en comparación con el control Ad-vacío (**figura 42A**). La infección con Ad-S3 también mostró una tendencia a reducir la secreción al medio extracelular de las quimioquinas CCL2 (**figura 42B**) y CCL5 (**figura 42C**), tanto en CMLV como en macrófagos RAW 264.7 incubados con citoquinas, aunque estos valores de inhibición no alcanzaron la significación estadística.

En macrófagos peritoneales de ratón analizamos también la expresión de receptores *scavenger* (CD204 y CD36) y de marcadores de macrófagos M1 (ArgII) y M2 (ArgI). La infección con Ad-S3 inhibió significativamente la expresión de mRNA de CD204 y CD36, aunque tuvo un efecto más discreto en la polarización de los macrófagos al fenotipo antiinflamatorio M2 (**figura 42D**).



**Figura 42. La transfección génica de SOCS3 disminuye la expresión de mediadores regulados por la vía JAK/STAT. (A)** Análisis mediante PCR a tiempo real de genes inflamatorios en CMLV transfectadas con Ad-vacío y Ad-S3 y estimuladas durante 6 horas con IFN $\gamma$  ( $10^3$  U/mL) e IL-6 ( $10^2$  U/mL). Ensayos ELISA para CCL2 (**B**) y CCL5 (**C**) en los sobrenadantes de CMLV y macrófagos RAW 264.7 estimulados durante 6 horas con citoquinas. (**D**) Expresión de mRNA de receptores *scavenger* y marcadores M1 y M2 en macrófagos peritoneales. Los valores representados son media $\pm$ EEM de 4 a 6 experimentos. \*P<0.05 vs basal; #P<0.05 vs Ad-vacío.

En último lugar, se evaluó el efecto de la transfección génica de SOCS3 en la proliferación celular. Los ensayos colorimétricos en CMLV y macrófagos RAW 264.7 demostraron que la infección con Ad-S3 redujo el efecto mitogénico de la estimulación con citoquinas, aunque esta tendencia no alcanzó niveles de significación estadística (**figura 43**).



**Figura 43. Efecto de SOCS3 en la proliferación celular. (A)** Ensayo de azul de metileno en CMLV tratadas con Ad-vacío y Ad-S3 y estimuladas durante 24 horas con IFN $\gamma$  ( $10^3$  U/mL) e IL-6 ( $10^2$  U/mL). **(B)** Proliferación de macrófagos RAW 264.7 a diferentes tiempos de estimulación con citoquinas. Los valores se expresan en incremento respecto del basal y son la media $\pm$ EEM de 4 experimentos analizados por triplicado. \*P<0.05 vs basal.

**V.DISCUSIÓN**





La diabetes mellitus es una enfermedad sistémica de gran prevalencia. El enorme impacto socio-sanitario de la diabetes es debido a sus complicaciones crónicas que afectan, entre otros órganos, al riñón y al sistema vascular. Sin embargo, los tratamientos actuales para prevenir o frenar estas complicaciones de la diabetes son limitados e insatisfactorios. En los últimos años se está dedicando un gran esfuerzo para conocer los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y progresión de las complicaciones de la diabetes y para explorar su potencial terapéutico.

El trabajo experimental aquí presentado contribuye a la identificación de nuevas dianas terapéuticas en la aterosclerosis y la nefropatía diabética basadas en la modulación de respuestas celulares y moléculas inflamatorias implicadas en ambos procesos patológicos. En la primera parte exploramos las consecuencias de inhibir la vía intracelular NF- $\kappa$ B en un modelo experimental de nefropatía y aterosclerosis producidas como consecuencia de la diabetes. Para ello, empleamos el péptido permeable NBD, capaz de bloquear la formación y activación del complejo IKK en la vía NF- $\kappa$ B y, como consecuencia, inhibir la translocación al núcleo del dímero p65-p50 y la posterior transcripción de los genes inflamatorios, ejerciendo de esta manera un efecto renoprotector y antiaterosclerótico en los ratones diabéticos. En la segunda parte estudiamos la modulación de JAK/STAT, la vía intracelular que regula la expresión de numerosas proteínas implicadas en el desarrollo de la placa de ateroma, siendo nuestra diana de actuación la familia de proteínas reguladoras SOCS. Para ello, desarrollamos un abordaje terapéutico experimental en la aterosclerosis inhibiendo la vía JAK/STAT mediante terapia génica con adenovirus recombinantes para SOCS3.

## **PARTE I: MODULACIÓN ESPECÍFICA DE LA ACTIVIDAD INFLAMATORIA DE NF- $\kappa$ B EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROPATÍA Y ATEROSCLEROSIS ASOCIADAS A DIABETES**

La nefropatía y la aterosclerosis son complicaciones vasculares comunes en la diabetes tipo 1 y tipo 2. Sin embargo, la patogénesis del daño renal y vascular en los pacientes diabéticos no está completamente aclarada. Además, los tratamientos actuales, como el control estricto de la glucosa y la hipertensión, consiguen frenar la evolución de la enfermedad pero no evitan en muchos casos la aparición de complicaciones crónicas, en especial los eventos cardiovasculares, la progresión de los pacientes a insuficiencia renal y su entrada en programas de diálisis y trasplante (126, 127). Esto es compatible con la hipótesis de que los mecanismos patogénicos y las rutas intracelulares claves que conducen a la progresión de las complicaciones diabéticas no se ven inhibidos o modificados por las terapias actuales (2, 85).

Varios investigadores han demostrado que la desregulación de la vía de activación de NF- $\kappa$ B contribuye a varias enfermedades inmunes e inflamatorias, entre ellas la diabetes (122, 128). De hecho, diversos polimorfismos genéticos de la vía NF- $\kappa$ B influyen en la susceptibilidad a la diabetes tipo 1 y 2 y en la aparición de complicaciones microvasculares y ateroscleróticas en los pacientes (129-131). Se sabe también que tanto la hiperglucemia como la dislipidemia, el estrés oxidativo y la inflamación pueden conducir a la aparición de las complicaciones diabéticas a través de la activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B y a la expresión de los genes que regula (88). Por ello, a lo largo de la última década, la modulación de la inflamación mediada por NF- $\kappa$ B se ha convertido en un importante campo de investigación para múltiples grupos internacionales.

Nuestros resultados en un modelo experimental que combina hiperglucemia e hipercolesterolemia (inducción de diabetes tipo 1 en ratones apoE<sup>-/-</sup>) demuestran, por un lado, una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el estado de activación de NF- $\kappa$ B en riñón y aorta y la severidad de la nefropatía y la aterosclerosis, respectivamente, lo que confirma el papel clave de la vía inflamatoria NF- $\kappa$ B en la patogénesis de las complicaciones diabéticas. Por otra parte, proporcionamos evidencia experimental de que el péptido NBD con permeabilidad celular y que inhibe la formación del complejo IKK, podría ser una potencial estrategia alternativa para suprimir la activación de NF- $\kappa$ B y las respuestas inflamatorias inducidas por la diabetes.

El péptido inhibidor empleado en estos estudios se diseñó a partir de la región NBD contenida en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del complejo de quinasa IKK. Las subunidades IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  presentan una gran homología y su estructura consta de cuatro dominios: el dominio quinasa N-terminal, el dominio central tipo-ubiquitina, el dominio de dimerización/plegamiento  $\alpha$ -hélice y el dominio NBD de unión a la subunidad IKK $\gamma$  o NEMO. La región NBD localizada en el extremo C-terminal (residuos L738-L743 en IKK $\alpha$  y L737-742 en IKK $\beta$ ) contiene la secuencia (TALDWSWLQTE) esencial para el ensamblaje y la estabilización de complejo heteromérico IKK $\alpha/\beta$ -NEMO. El péptido NBD sintetizado contiene esta secuencia de aminoácidos, lo que le permite bloquear la interacción entre las subunidades del complejo IKK (ver esquema de la **figura 7** en la página 27). Como control estructural empleamos un péptido mutante (sustitución W $\rightarrow$ A), cuya secuencia no incluye los dos residuos de triptófano claves en la formación del complejo IKK, resultando incapaz de inhibir la vía NF- $\kappa$ B. Además, estas secuencias (NBD y mutante) van unidas a un dominio de transducción proteica que les confiere capacidad de permeabilización celular. Las secuencias

de permeabilización celular son pequeñas secuencias de amino ácidos hidrofóbicos capaces de atravesar las membranas celulares y/o localizarse en compartimentos subcelulares. Existen varias secuencias, como la proteína Tat, la proteína Antennapedia de *Drosophila* o péptidos sintéticos ricos en arginina, lisina u ornitina (132). En este trabajo hemos empleado una secuencia de ocho lisinas (8K) unida a la región inhibidora NBD a través de un espaciador. Nuestros resultados demuestran que el péptido sintético NBD es internalizado por las células *in vitro* e *in vivo* y es capaz de inhibir la vía canónica de NF- $\kappa$ B y mejorar la disfunción renal y la aterosclerosis en los ratones diabéticos, principalmente a través de la atenuación de la respuesta inflamatoria local y sistémica. Las posibles ventajas de inhibir el complejo IKK basándose en el dominio NBD son varias: 1) no afecta al nivel de activación basal de NF- $\kappa$ B necesario para las respuestas fisiológicas celulares; 2) tiene un sitio de acción bien definido que lo hace específico para la vía clásica de activación; 3) no tiene reactividad cruzada con otras quinasas (133).

Estudios experimentales han descrito el potencial terapéutico de diversos péptidos permeables inhibidores de la vía NF- $\kappa$ B. Por ejemplo, el péptido P6 inhibe la fosforilación en Ser536 de RelA y presenta propiedades antifibróticas, pero no antiinflamatorias, en modelos de daño hepático (134). Asimismo, diversas secuencias inhibidoras de la translocación nuclear de los dímeros de NF- $\kappa$ B presentan interesantes propiedades antiinflamatorias en modelos animales de inflamación aguda en páncreas, hígado o pulmón (135-137). Estudios recientes de nuestro grupo han descrito un péptido inhibidor de la interacción entre el NF- $\kappa$ B activado y las importinas de la membrana nuclear y que reduce el tamaño de las placas de ateroma en ratones ateroscleróticos (138). En concordancia con estos estudios previos, nuestros resultados *in vitro* en células renales y vasculares expuestas a condiciones de hiperglucemia e inflamación, demuestran por vez primera que el péptido permeable NBD es capaz de bloquear la interacción entre la subunidad reguladora NEMO y las subunidades catalíticas IKK $\alpha/\beta$ , previniendo así la activación del complejo IKK y la posterior translocación nuclear de la subunidad p65. Observamos también que el péptido NBD disminuye de manera dosis dependiente la expresión de genes inducibles por NF- $\kappa$ B, como citoquinas y quimioquinas, además de la proliferación celular. Por el contrario, la secuencia mutada fue inactiva en todos los estudios *in vitro*. Es de destacar que, aunque el péptido NBD inhibió significativamente las respuestas celulares inducidas por la elevada concentración de glucosa o por estímulos inflamatorios, no modificó la actividad de NF- $\kappa$ B ni la viabilidad celular en condiciones basales o de normoglucemia. Como consecuencia, el papel fisiológico de NF- $\kappa$ B en las funciones normales de las células está preservado, lo que explicaría la baja toxicidad

observada para el péptido NBD. Esto supone un importante avance en comparación con otros inhibidores de NF- $\kappa$ B, como por ejemplo el compuesto BMS-345541, cuya toxicidad celular y sistémica se debe en parte a que induce apoptosis en células sanas (90, 139).

En cuanto a los estudios en tejido renal, nuestros datos representan la primera caracterización *in vivo* de los efectos protectores del péptido NBD en la nefropatía diabética. El tratamiento de ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos con dos dosis diferentes de péptido NBD no afectó a la severidad metabólica de la diabetes, como evidencian los valores similares de hiperglucemia, perfil lipídico y peso corporal encontrados en los ratones diabéticos de los grupos vehículo y tratamiento NBD. Además de una amplia distribución del péptido NBD en los tejidos murinos, el tratamiento durante 10 semanas produjo una acción antiinflamatoria efectiva y una mejora de la morfología renal, sin mostrar efectos secundarios ni signos de toxicidad o daño hepático. En los riñones de los ratones diabéticos tratados con el péptido NBD observamos una menor actividad intranuclear de NF- $\kappa$ B y una reducción en la expresión de genes regulados por este factor, junto con la mejora de las anomalías estructurales y funcionales inducidas por la diabetes.

Nuestros resultados son coherentes con estudios previos que caracterizan los efectos del bloqueo de NF- $\kappa$ B con varias versiones peptídicas del dominio NBD, tanto *in vitro* en monocitos/macrófagos, células dendríticas, células T, osteoclastos y fibroblastos estimulados con citoquinas (140-143), como *in vivo* en modelos animales de enfermedades inmunes e inflamatorias. Por ejemplo, en modelos murinos de artritis reumatoide, el péptido NBD redujo la hinchazón de las articulaciones, la destrucción de hueso y cartílago y los niveles de citoquinas proinflamatorias (142, 143). Asimismo, otro péptido NBD mejoró el edema y la inflamación pulmonar en cerdos (144), previno la necrosis y la degeneración de las extremidades posteriores en ratones con distrofia muscular (145) y previno la neuroinflamación en un modelo de encefalitis autoinmune (140). Una secuencia NBD idéntica a la nuestra fue capaz de inhibir *in vivo* la activación de NF- $\kappa$ B, la producción de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-17 y la inflamación en un modelo murino de colitis crónica espontánea (141). Todos estos estudios, junto con los mostrados en el presente trabajo, sugieren que la inhibición selectiva de NF- $\kappa$ B mediante el péptido NBD puede ser una estrategia terapéutica efectiva en diversas patologías, en particular en las complicaciones de la diabetes.

Es bien sabido que la producción excesiva de citoquinas y factores de crecimiento participa en la patogénesis de la nefropatía diabética, siendo el crecimiento celular y la fibrosis los mayores contribuyentes a los cambios patológicos asociados a esta enfermedad (22, 28).

Además, la hiperglucemia aumenta la expresión de genes inflamatorios y acelera el reclutamiento de leucocitos desde el torrente circulatorio. Los leucocitos infiltrados contribuyen al daño renal diabético, tanto por interacción directa con células mesangiales o tubulares, como a través de la liberación de factores proinflamatorios y profibróticos (12). Nuestro trabajo demuestra que la administración del péptido NBD en ratones diabéticos mejora los parámetros de función renal (creatinina sérica y relación albúmina/creatinina en orina) y las lesiones glomerulares causadas por la diabetes, como el infiltrado de monocitos/macrófagos y células T, la hipertrofia, la expansión mesangial y la glomeruloesclerosis. El péptido también protege del desarrollo de atrofia tubular, inflamación y fibrosis intersticial, parámetros característicos de la insuficiencia renal terminal. Estas observaciones, junto con una expresión reducida de quimioquinas (CCL2 y CCL5), citoquinas (TNF $\alpha$ ), factores de crecimiento (TGF $\beta$ ) y proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágeno tipo 1) sugieren que el tratamiento con el péptido NBD atenúa de forma efectiva la inflamación renal y la fibrosis, dos mecanismos clave de la enfermedad renal diabética. Por lo tanto, nuestros hallazgos definen la vía NF- $\kappa$ B como un objetivo importante para el desarrollo de agentes terapéuticos en la nefropatía diabética.

Cabe destacar también que NF- $\kappa$ B es un importante factor proaterogénico que regula la expresión de numerosos genes involucrados en todas las fases del proceso aterosclerótico, desde la formación temprana de estrías grasas y la progresión de la placa avanzada hasta las complicaciones trombóticas (88, 146) y, por tanto, constituye una interesante diana para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos en enfermedades cardiovasculares. En este sentido, estudios en modelos experimentales de aterosclerosis han mostrado la eficacia de diversos compuestos que inhiben diferentes etapas en la vía de NF- $\kappa$ B (p. ej. la activación del complejo IKK, la fosforilación y/o degradación de I $\kappa$ B, la translocación nuclear de los dímeros activados, la unión al DNA y la transactivación de genes) y que podrían ser utilizados en el futuro para el tratamiento de pacientes (115, 146). Entre ellos destacan sustancias fitoquímicas como resveratrol, ácido gálico, curcumina, ácido acetil-boswélico y parthenolide, capaces de reducir las lesiones ateroscleróticas en ratones (147-150) y que se encuentran en fase II/III de desarrollo clínico en enfermedades inflamatorias. Una búsqueda reciente en el sitio web *ClinicalTrials.gov* proporciona información de 2 ensayos clínicos de parthenolide en dermatitis, 5 ensayos clínicos de ácido gálico en enfermedades inmunes y 97 estudios en diferentes fases con resveratrol en pacientes con apnea, Alzheimer, enfermedades del sistema nervioso central, demencia, enfermedad pulmonar, carcinoma, diabetes o aterosclerosis. Otros inhibidores químicos, como los antioxidantes

tiocarbamato de pirrolidina (151) y ebselen (89) o el inhibidor de la translocación nuclear, dehidroximetilepoxiquinomicina (152), también han mostrado propiedades beneficiosas en modelos animales de aterosclerosis y/o diabetes (115).

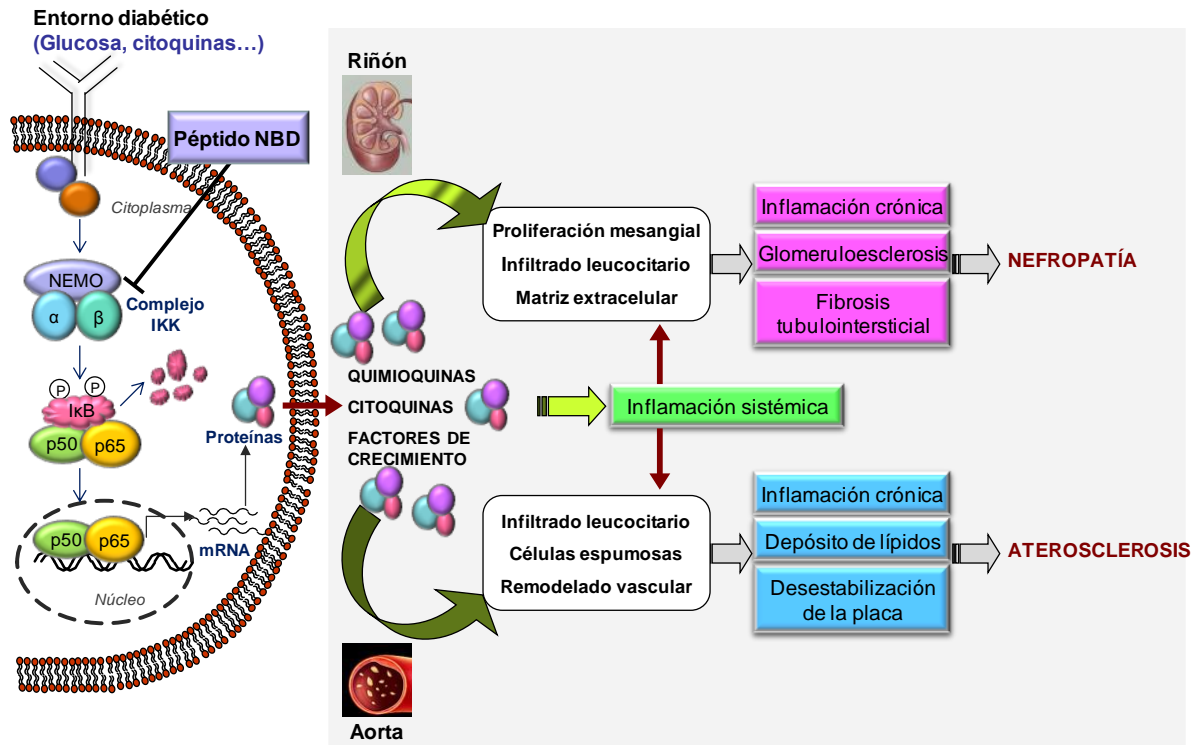
En línea con los estudios mencionados, nuestro trabajo proporciona evidencias *in vivo* de que la inhibición del complejo IKK con el péptido NBD atenúa de manera dosis dependiente la activación de NF- $\kappa$ B en aorta y limita la formación de la placa de ateroma en los ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos. Este efecto ateroprotector concuerda con una publicación reciente que demuestra una mejora de la disfunción vascular, en términos de tono miogénico y relajación dependiente del endotelio, en las arterias mesentéricas de resistencia y coronarias de ratones con diabetes tipo 2 tratados con péptido NBD (153). De manera significativa, nuestro tratamiento con NBD no solo redujo el tamaño de las lesiones ateroscleróticas y su extensión a lo largo de la aorta, sino que también alteró la composición y la inflamación de las placas de los ratones diabéticos, sin afectar el perfil lipídico en sangre. De hecho, la disminución del tamaño de la placa de ateroma en los ratones tratados con NBD se correlacionó con una reducción en el contenido de macrófagos y células T en las lesiones y con una menor expresión aórtica de quimioquinas y citoquinas (CCL2, CCL5 y TNF $\alpha$ ). Estos factores proinflamatorios promueven cambios en las células del vaso, entre ellas las CMLV, que pierden parcialmente su fenotipo contráctil y adquieren un fenotipo sintético, con carácter migratorio y proliferativo. De esta forma, las CMLV se movilizan desde la media hasta la íntima donde forman la neointima, proliferan y sintetizan citoquinas y componentes de la matriz extracelular, contribuyendo al desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (154).

El tratamiento de los ratones diabéticos con el péptido NBD también promovió un fenotipo de placa más estable, caracterizado por un aumento en colágeno y  $\alpha$ -actina (marcador de CMLV) y una disminución en el contenido de lípidos y macrófagos. Estudios en pacientes sugieren que la ruptura de las placas ateroscleróticas, que ocurre particularmente en los laterales (también llamados hombros) se asocia con un incremento en el número de macrófagos y células T infiltradas, junto con una disminución de las CMLV. (154). Por tanto, considerando que los eventos clínicos más graves de la aterosclerosis, como el infarto de miocardio y el ictus, están causados por la ruptura de una placa inestable (rica en leucocitos y lípidos, pobre en colágeno) (155), proponemos que la modulación de las respuestas celulares perjudiciales mediadas por la activación de la vía IKK/NF- $\kappa$ B podría ser una estrategia eficaz para retrasar la progresión de la lesión aterosclerótica.

Además del efecto antiinflamatorio local del péptido NBD observado en el tejido renal y aórtico de los ratones diabéticos, también detectamos una acción indirecta del tratamiento sobre la inflamación sistémica. Así, los estudios de expresión génica en muestras de bazo demostraron una reducción en la expresión de citoquinas proinflamatorias características de la respuesta Th1 (IFN $\gamma$ , IL-12 y TNF $\alpha$ ), pero no de los genes antiinflamatorios Th2 (IL-4 e IL-10). Varios estudios describen que NF- $\kappa$ B media la diferenciación de las células Th1 y que tanto la sobre-expresión de I $\kappa$ B en las células T como la deficiencia total de la subunidad c-Rel causan una respuesta Th1 defectuosa, con menor producción de IFN $\gamma$  (156, 157). Además, en pacientes con diabetes, los niveles elevados de esta citoquina Th1 se correlacionan con la proteinuria (158) y el riesgo de complicaciones cardiovasculares (159). También se ha demostrado que el desequilibrio entre las respuestas Th1 y Th2 contribuye al desarrollo de aterosclerosis, de manera que el aumento de citoquinas Th1, en particular IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2, promueve la inflamación vascular, mientras que las respuestas Th2 y Treg reducen esta inflamación (60). En concordancia con estos hechos, nuestros resultados indican que la regulación de la inflamación sistémica mediada por citoquinas Th1 puede explicar, al menos en parte, el efecto protector *in vivo* del péptido NBD en los ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos.

En conclusión, nuestros resultados (**figura 44**) demuestran que el péptido NBD es capaz de inhibir las respuestas inflamatorias mediadas por NF- $\kappa$ B en ratones diabéticos, reduciendo así la progresión de nefropatía y aterosclerosis asociadas a la diabetes. Debido al papel fundamental de la activación de NF- $\kappa$ B, sugerimos que la inhibición selectiva de la vía clásica de NF- $\kappa$ B dependiente de IKK podría ser una potencial diana terapéutica en las complicaciones inflamatorias de la diabetes.





**Figura 44. Mecanismos de acción de la vía NF-κB implicados en la patología del daño renal y vascular durante la diabetes.** En un entorno diabético, la activación de la vía clásica de NF-κB induce la expresión de numerosos genes proinflamatorios que alteran la funcionalidad de las células renales y vasculares, lo que acelera el desarrollo de nefropatía y aterosclerosis. El tratamiento experimental con el péptido NBD inhibe los mecanismos dependientes de la vía IKK/NF-κB, reduciendo así la inflamación sistémica y local y el daño renal y vascular asociados a la diabetes.

## **PARTE II: INHIBICIÓN CONSTITUTIVA DE LA VÍA JAK/STAT EN LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL MEDIANTE TERAPIA GÉNICA CON SOCS3**

La terapia génica es una de las disciplinas biomédicas que ha permitido desarrollar técnicas y protocolos para tratar enfermedades cuyo origen radica en la alteración de la expresión génica o proteica. La terapia génica consiste en la introducción de ácidos nucleicos (DNA o RNA) en células, tejido u órganos diana para permitir aumentar o disminuir la expresión de una proteína con finalidad terapéutica, empleado diferentes vectores que permiten la expresión del gen de interés durante largos periodos de tiempo (160). Los vectores más característicos son los derivados de virus, preferentemente con genomas de DNA o con una fase de su ciclo vital como DNA de doble cadena (161). Además, es conveniente que tengan orígenes de replicación que multipliquen eficientemente sus genomas, para conseguir un elevado porcentaje del gen clonado. Entre los virus más utilizados como vectores eucarióticos están los retrovirus, los adenoasociados y los adenovirus (162).

En este trabajo exploramos, en un modelo experimental de aterosclerosis, si la administración intravenosa de un vector adenoviral que codifica el gen SOCS3 es un método efectivo para elucidar *in vivo* el papel modulador de las proteínas SOCS durante el proceso aterogénico. Como resultado de la inyección del adenovirus, observamos una elevada expresión local del transgen en la aorta de ratones apoE<sup>-/-</sup>, sugiriendo una acción directa de SOCS3 sobre las células que constituyen la lesión aterosclerótica. Además, nuestro estudio demuestra que la administración del gen SOCS3 retrasa el desarrollo de aterosclerosis en los ratones y confirma que esta proteína es clave en el mantenimiento del equilibrio entre las respuestas proinflamatoria y antiinflamatoria. Entre los mecanismos implicados, demostramos que SOCS3 reprime la activación de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 en las células de vaso y reduce la expresión de los genes dependientes de esta vía, como quimioquinas y sus receptores, moléculas de adhesión, citoquinas proinflamatorias y receptores *scavenger*. Como consecuencia, se impide el flujo de leucocitos a la zona de la lesión, se altera el balance fenotípico de monocitos/macrófagos y se reduce la activación de CMLV y el depósito de lípidos, favoreciendo así la estabilidad de la placa de ateroma.

La vía de señalización intracelular JAK/STAT regula la expresión de genes implicados en el inicio, progresión y remodelado vascular durante la aterosclerosis. Diversos estudios han demostrado la activación de JAK/STAT en las lesiones ateroscleróticas de pacientes y modelos experimentales, así como en células vasculares estimuladas con citoquinas, lípidos y AngII (91, 102, 113, 114), por lo que se ha propuesto esta vía intracelular como posible

diana terapéutica en enfermedades cardiovasculares. Las proteínas SOCS inducibles por JAK/STAT son capaces de bloquear la activación y/o fosforilación de JAK y STAT, constituyendo así un circuito de retroalimentación negativa. Las alteraciones en este mecanismo regulador de la familia SOCS participan en la patogenia de diversas enfermedades inmunes e inflamatorias (92, 93), incluyendo las enfermedades cardiovasculares (163). Por ejemplo, la expresión local de proteínas SOCS aumenta en condiciones de inflamación crónica y aguda (164) y se ha propuesto que sus niveles en células mononucleares de sangre periférica podrían ser un buen marcador cardiovascular en pacientes de enfermedad renal crónica (165). Trabajos previos de nuestro grupo describen la presencia de SOCS1 y SOCS3 en las placas ateroscleróticas humanas procedentes de endarterectomía carotídea (principalmente localizada en las CMLV y los macrófagos de la zona inflamatoria) (91) y también en biopsias renales de pacientes diabéticos (localización glomerular y tubular) (116). Varios estudios en ratones confirman una expresión diferencial de proteínas SOCS en las lesiones ateroscleróticas en desarrollo (91, 166, 167). En modelos experimentales, la inducción de proteínas de la familia SOCS o el uso de análogos proteicos son capaces de reducir la respuesta inmune innata (168) y de prevenir la aterosclerosis (169), la miocarditis autoinmune (170) y la progresión de las complicaciones de la diabetes (aterosclerosis y nefropatía) (116, 120). En cuanto a estudios específicos con la proteína SOCS3, se ha observado que su sobre-expresión previene el desarrollo de la artritis experimental a través de la inhibición de las respuestas Th1, Th2 y especialmente Th17 (117). Asimismo, en un modelo de endotoxemia letal, la administración del gen SOCS3 mediada por liposomas mejora la supervivencia de los ratones (171). Por el contrario, el silenciamiento de las proteínas SOCS provoca una activación continuada de STAT y exacerba la respuesta inflamatoria de ratones ateroscleróticos (91, 121). De acuerdo con estos estudios, el presente trabajo es la primera evidencia del efecto ateroprotector y antiinflamatorio de la expresión de SOCS3 mediada por adenovirus en el contexto de la aterosclerosis.

Nuestros resultados demuestran que la administración del gen SOCS3 disminuye la activación de STAT1 y STAT3 en las lesiones ateroscleróticas de ratones apoE<sup>-/-</sup> y, como consecuencia, limita la formación de las placas de ateroma. Los mecanismos subyacentes son independientes de cambios lipídicos, ya que no encontramos diferencias significativas en los niveles de colesterol (total, HDL y LDL) y triglicéridos. Sin embargo, la inducción de SOCS3 altera el tamaño y la composición de las lesiones ateroscleróticas e inhibe la inflamación en la placa, como se demuestra por una menor expresión de genes inflamatorios involucrados

en el reclutamiento, migración y activación de los monocitos y linfocitos circulantes y de las CMLV de la pared vascular.

Es importante mencionar que la administración del gen SOCS3 en ratones apoE<sup>-/-</sup> inhibe de forma efectiva el desarrollo de aterosclerosis en las fases tempranas de la enfermedad, pero no consigue reducir significativamente su progresión en fases más avanzadas. Este efecto paradójico en la regulación de la aterosclerosis puede ser atribuido a la función dual de STAT3, el principal factor de transcripción regulado por SOCS3 (92, 163, 172). De hecho, se ha observado que STAT3 regula la transcripción de citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias y también suprime la activación de NF-κB y la expresión de genes inflamatorios (163). En el corazón, la señalización de STAT3 contribuye a la cardioprotección después del daño por isquemia/reperfusión, promoviendo la supervivencia de los cardiomiocitos (173). Nuestro estudio previo demuestra que el bloqueo *in vivo* de SOCS3 con oligodeoxinucleótidos antisentido exacerba el proceso de aterosclerosis temprana, con un aumento del tamaño de la lesión, el contenido leucocitario y la producción de quimioquinas (91). Por el contrario, la deficiencia específica de SOCS3 en linfocitos T reduce la aterosclerosis y la inflamación vascular en ratones (174). Por tanto, es factible que SOCS3 pueda tener múltiples funciones en fases más avanzadas de la aterosclerosis, reflejando así un mecanismo más complejo de esta proteína que necesita más estudios de validación.

El análisis histológico de la lesiones ateroscleróticas tempranas en nuestro modelo experimental revela que la sobre-expresión de SOCS3 con adenovirus es capaz de reducir la acumulación de leucocitos (células T y macrófagos) en las placas, además de afectar al estado inflamatorio de los macrófagos infiltrados. Está descrito que SOCS3 suprime la formación de macrófagos M1 del tipo inflamatorio y favorece la generación de los macrófagos M2 implicados en procesos de resolución de la inflamación y de reparación tisular (175). Estudios previos han establecido que los macrófagos M2 de las placas ateroscleróticas muestran menor capacidad para acumular lípidos y transformarse en células espumosas (45, 176), mientras que los macrófagos M1 acumulados en los vasos dañados son capaces de secretar numerosas citoquinas inflamatorias encargadas de amplificar la respuesta Th1, inducir la proliferación de CMLV y favorecer la oxidación de lipoproteínas por la producción de especies reactivas de oxígeno (46, 53). Nuestros resultados en las lesiones de ratones transfectados con el gen SOCS3 muestran, además del menor contenido de macrófagos, una predominancia del fenotipo antiinflamatorio M2, lo que refuerza el

potencial papel beneficioso de SOCS3 en la resolución de la inflamación en las placas de ateroma.

Las lesiones ateroscleróticas de ratones tratados con adenovirus recombinante SOCS3 presentaron un menor contenido lipídico y mayor contenido de colágeno en comparación con las lesiones de los grupos control, confirmando así un fenotipo de placa menos inflamada y más estable. Al mismo tiempo, en el tejido aórtico de los ratones tratados se detectó una expresión reducida de CD204 y CD36, dos receptores *scavenger* involucrados en la internalización de LDL modificadas y en la formación de células espumosas (45, 177). La expresión de CD204 y CD36 se ha visto aumentada en pacientes con síndrome coronario agudo y en modelos animales de aterosclerosis (178) y su inhibición reduce la formación de células espumosas y el tamaño y la complejidad de las lesiones, lo que promueve su estabilidad (179). Puesto que la ruptura de una placa inestable (rica en leucocitos y lípidos y pobre en colágeno) es el principal causante de las complicaciones más severas de la aterosclerosis, proponemos el potencial uso de estrategias basadas en las proteínas SOCS para modular las respuestas dependientes de JAK/STAT y ralentizar así la progresión de las lesiones.

Nuestros datos *in vitro* confirman la función esencial de la proteína SOCS3 en la regulación de la activación proaterogénica excesiva de las CMLV y los macrófagos, dos importantes componentes celulares de la placa. En estas células, la sobre-expresión de SOCS3 previene la activación de STAT3, y en menor medida de STAT1, inducida por la estimulación con IFN $\gamma$  e IL-6, dos citoquinas proaterogénicas implicadas en la formación y desestabilización de la placa (61). Asimismo, SOCS3 reduce la expresión de genes regulados por STAT (citoquinas, quimioquinas, receptores de quimioquinas, moléculas de adhesión y receptores *scavenger*), a la vez que aumenta los niveles de Arg1, el marcador de fenotipo M2 de macrófagos, alterando así en las células del vaso la capacidad proliferativa, la liberación de mediadores y la formación de células espumosas, mecanismos subyacentes implicados en la aceleración de la aterosclerosis *in vivo*.

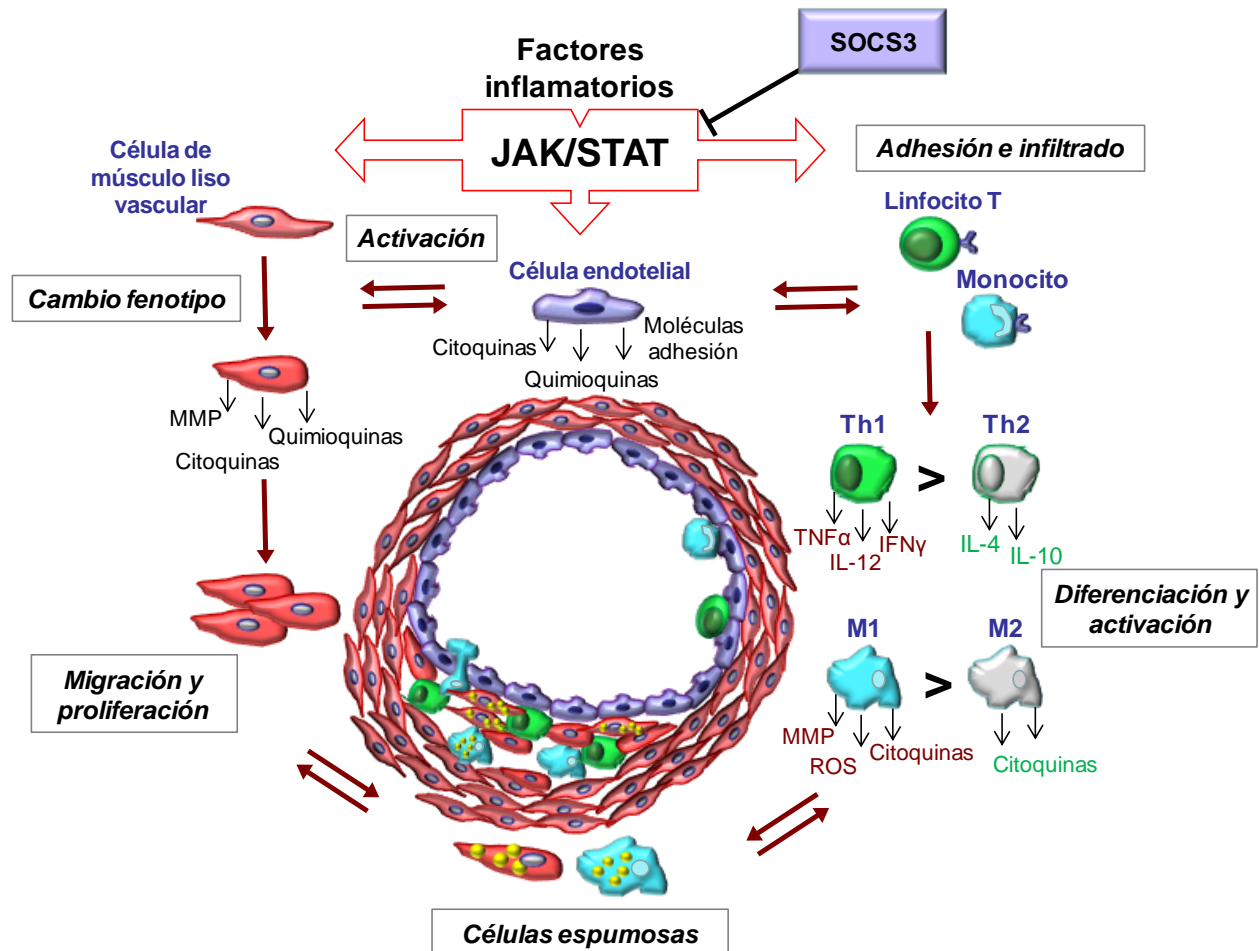
En este estudio no podemos excluir, además del efecto local de la expresión de SOCS3 en las placas ateroscleróticas de los ratones, una posible acción indirecta sobre la inflamación sistémica. En primer lugar, el análisis por citometría de flujo de la expresión diferencial del marcador de monocitos murinos Ly6C muestra que la administración de SOCS3 reduce la proporción relativa de monocitos inflamatorios Ly6C<sup>alto</sup> (equivalente al subtipo clásico CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> en humanos) en sangre periférica, pero no en médula ósea y bazo. Estudios

previos describen que los monocitos clásicos Ly6C<sup>alto</sup> expresan niveles elevados de CCR2 y bajos de CX3CR1, presentan propiedades *scavenger* y son los principales productores de citoquinas como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (180). Además, son estos monocitos Ly6C<sup>alto</sup> los que preferentemente interaccionan con el endotelio activado de los ratones ateroscleróticos e infiltran la placa de ateroma en desarrollo, donde se diferencian principalmente a macrófagos (algunos pueden adquirir fenotipo de célula dendrítica) y se convierten en células espumosas, participando de forma activa en la progresión y ruptura de la placa. Por su parte, los monocitos Ly6C<sup>bajo</sup> (equivalente al subtipo no clásico CD14<sup>-</sup>CD16<sup>++</sup> en humanos) expresan niveles elevados de CX3CR1 y bajos de CCR2, no son capaces de expandirse, se infiltran en las lesiones con menor frecuencia que los monocitos Ly6C<sup>alto</sup>, exhiben funciones fagocíticas y proangiogénicas y pueden madurar de manera preferencial a células dendríticas (46). En relación con estos hallazgos, nuestro trabajo sugiere que la administración de SOCS3 en los ratones ateroscleróticos altera las poblaciones de monocitos circulantes y su reclutamiento diferencial hacia el sitio de la lesión, limitando de esta forma el proceso de inflamación vascular y promoviendo procesos de reparación mediados por macrófagos M2.

Simultáneamente al efecto en los monocitos circulantes, la terapia génica con SOCS3 induce cambios en la expresión sistémica de genes relacionados con las respuestas de linfocitos T, lo que indica que SOCS3 afecta la respuesta inmune adaptativa en esta fase de la enfermedad. En concreto observamos una reducción en los niveles de las citoquinas proinflamatorias IFN $\gamma$  (respuesta Th1) e IL-17 (respuesta Th17) y una tendencia no significativa a aumentar Foxp3 (respuesta Treg). Estudios previos han establecido que las citoquinas relacionadas con las respuestas proinflamatorias Th1 y Th17 promueven el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis, mientras que los genes antiinflamatorios Th2 y Treg son ateroprotectores (61, 181, 182). Además, SOCS3 promueve la diferenciación de las células Th2, a la vez que inhibe la diferenciación a Th1 y Th17 (163, 167). En concordancia con estos hechos, nuestros resultados sugieren que los mecanismos sistémicos (reducción del estado de activación de monocitos circulantes y alteración de la expresión de genes de Th1, Th17 y Treg) contribuyen al efecto ateroprotector de SOCS3 en los ratones ateroscleróticos.

En conjunto, este estudio aporta la primera evidencia de que la administración del gen SOCS3 disminuye la aterosclerosis y la inflamación vascular e incrementa la estabilidad de las placas de ateroma en un modelo experimental (**figura 45**). Proponemos que la modulación

de la familia de proteínas SOCS podría ser una interesante aproximación terapéutica para prevenir la activación patológica de la vía JAK/STAT durante la aterosclerosis.



**Figura 45. Mecanismos de acción de la vía JAK/STAT implicados en la patogénesis de la aterosclerosis.** Diversos factores proinflamatorios y proaterogénicos inducen, a través de la vía JAK/STAT, la expresión génica de mediadores implicados en la activación de células endoteliales, el reclutamiento de leucocitos hacia el interior del vaso, la diferenciación de linfocitos y monocitos, el cambio fenotípico de las CMLV y la formación de células espumosas. La administración del adenovirus de SOCS3 inhibe la activación de STAT1 y STAT3 y previene el desarrollo de la placa aterosclerótica en el modelo experimental.

## **VI.CONCLUSIONES**





## **1. La inhibición específica de la actividad inflamatoria de NF- $\kappa$ B empleando el péptido permeable NBD previno en daño renal y vascular inducidos por la diabetes.**

1.1. En cultivos de células renales y vasculares murinas, la internalización del péptido NBD, pero no su control estructural mutante, bloqueó la interacción entre las subunidades IKK $\gamma$  e IKK $\alpha/\beta$  y previno la activación de NF- $\kappa$ B, reduciendo así la expresión de sus genes dependientes (CCL2, CCL5 y TNF $\alpha$ ) y la proliferación celular inducidas por las condiciones de hiperglucemia e inflamación.

1.2. El tratamiento *in vivo* con el péptido NBD mejoró de forma dosis-dependiente la función renal de los ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos y redujo las lesiones renales (expansión mesangial, fibrosis e infiltrado leucocitario) sin alterar los niveles de hiperglucemia ni el perfil lipídico.

1.3. Los riñones de ratones diabéticos tratados con el péptido NBD mostraron una reducción de la activación de NF- $\kappa$ B y de la expresión de genes relacionados con inflamación (CCL2, CCL5 y TNF $\alpha$ ), daño tubular (KIM-1) y fibrosis (TGF- $\beta$ , fibronectina y colágeno-1).

1.4. El tratamiento con el péptido NBD previno el desarrollo de aterosclerosis acelerada por diabetes, reduciendo significativamente el tamaño, extensión y contenido lipídico de las placas de ateroma en los ratones apoE<sup>-/-</sup> diabéticos.

1.5. El péptido NBD suprimió la actividad NF- $\kappa$ B en las lesiones ateroscleróticas, redujo su componente inflamatorio (macrófagos, linfocitos T, citoquinas y quimioquinas) y aumentó los parámetros de estabilidad (colágeno y células de músculo liso vascular), a la vez que disminuyó la expresión sistémica de citoquinas proinflamatorias de respuesta Th1.

## **2. La inhibición de la vía JAK/STAT mediante terapia génica con SOCS3 previno el desarrollo de aterosclerosis en ratones.**

2.1. La expresión del transgen SOCS3 mediante adenovirus recombinantes inhibió la activación de STAT1 y STAT3 en la aorta de ratones apoE<sup>-/-</sup> y redujo el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en la fase inicial del modelo experimental, pero no consiguió frenar la progresión de las lesiones avanzadas.

2.2. La terapia génica con SOCS3 promovió un fenotipo de placa más estable, caracterizado por un menor contenido de lípidos, linfocitos T y macrófagos proinflamatorios (M1) y un mayor contenido de colágeno y macrófagos antiinflamatorios (M2).

2.3. El tratamiento con adenovirus de SOCS3 redujo la expresión de genes proinflamatorios y proaterogénicos (citoquinas, quimioquinas, receptores de quimioquinas, moléculas de

adhesión y receptores *scavenger*) en las lesiones ateroscleróticas de ratones apoE<sup>-/-</sup> y atenuó la inflamación sistémica (citoquinas Th1 y Th17) y el estado de activación de los monocitos circulantes (proporción Ly6C<sup>alto</sup> vs Ly6C<sup>bajo</sup>).

2.4. *In vitro*, SOCS3 suprimió la activación de STAT1 y STAT3 y redujo la expresión de genes inflamatorios y la proliferación de células de músculo liso vascular y macrófagos estimulados con citoquinas.

En conclusión, los estudios presentados en esta tesis ayudan a conocer mejor los mecanismos inflamatorios implicados en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y la nefropatía diabética y proporcionan las bases para el desarrollo racional de nuevas terapias aplicables a las complicaciones de la diabetes, una enfermedad de gran impacto clínico y cuyo coste económico continúa en alza a pesar de las mejoras en su tratamiento. Proponemos, por tanto, que la modulación basada en la inhibición de NF-κB a través del péptido permeable NBD o la inhibición de la vía JAK/STAT mediante la sobre-expresión de la proteína SOCS3 podrían ser interesantes abordajes terapéuticos en estas patologías.

## **VII.BIBLIOGRAFÍA**



1. Lim AK. Diabetic nephropathy - complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2014;7:361-81.
2. Fernandez-Fernandez B, Ortiz A, Gomez-Guerrero C, Egido J. Therapeutic approaches to diabetic nephropathy--beyond the RAS. *Nat Rev Nephrol* 2014;10(6):325-46.
3. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab* 2013 8;17(1):20-33.
4. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4(8):444-52.
5. Soetikno V, Arozal W, Louisa M, Setiabudy R. New insight into the molecular drug target of diabetic nephropathy. *Int J Endocrinol* 2014;2014:968681.
6. Duran-Salgado MB, Rubio-Guerra AF. Diabetic nephropathy and inflammation. *World J Diabetes* 2014 15;5(3):393-8.
7. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(3):433-42.
8. Mima A. Inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy: new insights on its inhibition as new therapeutic targets. *J Diabetes Res* 2013;2013:248563.
9. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54(6):1615-25.
10. Tavafi M. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. *J Renal Inj Prev* 2013;2(2):59-62.
11. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Unger T. The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundam Clin Pharmacol* 2009;23(6):693-703.
12. Lim AK, Tesch GH. Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators Inflamm* 2012;2012:146154.
13. Coimbra TM, Janssen U, Grone HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H, Brabant G, Floege J. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int* 2000;57(1):167-82.
14. Galkina E, Ley K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(2):368-77.
15. Matsui H, Suzuki M, Tsukuda R, Iida K, Miyasaka M, Ikeda H. Expression of ICAM-1 on glomeruli is associated with progression of diabetic nephropathy in a genetically obese diabetic rat, Wistar fatty. *Diabetes Res Clin Pract* 1996;32(1-2):1-9.
16. Shikata K, Makino H. Microinflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig* 2013 18;4(2):142-9.

17. Koenen RR, Weber C. Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis. *EMBO Mol Med* 2011;3(12):713-25.
18. Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992 15;148(8):2423-8.
19. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991;9:617-48.
20. Ruster C, Wolf G. The role of chemokines and chemokine receptors in diabetic nephropathy. *Front Biosci* 2008;13:944-55.
21. Mariappan MM. Signaling mechanisms in the regulation of renal matrix metabolism in diabetes. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:749812.
22. Kanwar YS, Sun L, Xie P, Liu FY, Chen S. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annu Rev Pathol* 2011;6:395-423.
23. Vallon V, Thomson SC. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol* 2012;74:351-75.
24. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Zeeuw D. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int* 2004;65(6):2003-17.
25. Brosius FC, III. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 2008;9(4):245-54.
26. Shahbazian H, Rezaei I. Diabetic kidney disease; review of the current knowledge. *J Renal Inj Prev* 2013;2(2):73-80.
27. Roberts AB, Tian F, Byfield SD, Stuelten C, Ooshima A, Saika S, Flanders KC. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17(1-2):19-27.
28. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006;69(2):213-7.
29. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF-beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 2004;15 Suppl 1:S55-S57.
30. Diamond-Stanic MK, You YH, Sharma K. Sugar, sex, and TGF-beta in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2012;32(3):261-8.
31. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792(8):746-56.
32. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 2013;93(1):137-88.
33. McKay GJ, Savage DA, Patterson CC, Lewis G, McKnight AJ, Maxwell AP. Association analysis of dyslipidemia-related genes in diabetic nephropathy. *PLoS One* 2013;8(3):e58472.

34. Chen SC, Tseng CH. Dyslipidemia, kidney disease, and cardiovascular disease in diabetic patients. *Rev Diabet Stud* 2013;10(2-3):88-100.
35. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011;12(3):204-12.
36. Abraham Kierszenbaum, Laura Tres. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 2007.
37. Lafont A. Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart* 2003;89(10):1262-7.
38. Johnson JL. Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2014 1;103(4):452-60.
39. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011 19;473(7347):317-25.
40. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005 20;46(6):937-54.
41. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* 2014;5(8):927-46.
42. Wang SY, Hsieh MC, Tu ST, Chuang CS. New frontiers in the treatment of diabetic dyslipidemia. *Rev Diabet Stud* 2013;10(2-3):204-12.
43. Sessa R, Pietro MD, Filardo S, Turriziani O. Infectious burden and atherosclerosis: A clinical issue. *World J Clin Cases* 2014 16;2(7):240-9.
44. Hulsmans M, Holvoet P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2010;14(1-2):70-8.
45. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011 29;145(3):341-55.
46. Swirski FK, Weissleder R, Pittet MJ. Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(10):1424-32.
47. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 29;92(18):8264-8.
48. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23(11):549-55.
49. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M, Dussiot M, Levillain O, Graff-Dubois S, Nicoletti A, Caligiuri G. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 2010;5(1):e8852.
50. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5(12):953-64.



51. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992 1;176(1):287-92.
52. Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 2007;6(2):137-43.
53. Pello OM, Silvestre C, De PM, Andres V. A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology* 2011;216(11):1172-6.
54. Van Vre EA, Van B, I, Bosmans JM, Vrints CJ, Bult H. Dendritic cells in human atherosclerosis: from circulation to atherosclerotic plaques. *Mediators Inflamm* 2011;2011:941396.
55. Tse K, Tse H, Sidney J, Sette A, Ley K. T cells in atherosclerosis. *Int Immunol* 2013;25(11):615-22.
56. Mallavia B, Oguiza A, Lopez-Franco O, Recio C, Ortiz-Munoz G, Lazaro I, Lopez-Parra V, Egido J, Gomez-Guerrero C. Gene Deficiency in Activating Fcgamma Receptors Influences the Macrophage Phenotypic Balance and Reduces Atherosclerosis in Mice. *PLoS One* 2013;8(6):e66754.
57. Ketelhuth DF, Hansson GK. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall. *Thromb Haemost* 2011;106(5):779-86.
58. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010 28;32(5):593-604.
59. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003;73(2):209-12.
60. Lintermans LL, Stegeman CA, Heeringa P, Abdulahad WH. T cells in vascular inflammatory diseases. *Front Immunol* 2014;5:504.
61. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(5):969-79.
62. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 15;88(12):5252-6.
63. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999;104(8):1041-50.
64. Braunersreuther V, Zernecke A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Burger F, Pelli G, Luckow B, Mach F, Weber C. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(2):373-9.
65. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107(10):1255-62.

66. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 2013;34(31):2436-43.
67. Harja E, Bu DX, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, Kalea AZ, Lu Y, Rosario RH, Oruganti S, Nikolla Z, Belov D, Lalla E, Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE<sup>-/-</sup> mice. *J Clin Invest* 2008;118(1):183-94.
68. Srivastava AK. High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review). *Int J Mol Med* 2002;9(1):85-9.
69. Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, Fowler DR, Weber DK, Varghese PJ, Farb A, Virmani R. Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(7):1266-71.
70. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab* 2011 2;14(5):575-85.
71. Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, Jerrold M. Olefsky. *Diabetes Mellitus. A Fundamental and Clinical Text*. 3 ed. 2004.
72. Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(8):1254-62.
73. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008 8;132(3):344-62.
74. Virginia Lopez-Parra, Beñat Mallavia, Jesus Egido, Carmen Gomez-Guerrero. Immunoinflammation in Diabetic Nephropathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Options. In: John Chan, ed. *Diabetic Nephropathy*. 2012. p. 127-46.
75. Yamamoto Y, Gaynor RB. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 2004;29(2):72-9.
76. Neumann M, Naumann M. Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J* 2007;21(11):2642-54.
77. Kutuk O, Basaga H. Inflammation meets oxidation: NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2003;9(12):549-57.
78. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999;45(1):7-17.
79. Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998;38(11):981-93.
80. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107(1):7-11.
81. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 2006 30;25(51):6887-99.

82. Hinz M, Scheidereit C. The IkappaB kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond. *EMBO Rep* 2014;15(1):46-61.
83. Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, Akutsu M, Suzuki N, Kato R, Kensche T, Uejima T, Bloor S, Komander D, Randow F, Wakatsuki S, Dikic I. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell* 2009 20;136(6):1098-109.
84. May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, Glockner J, Pober JS, Ghosh S. Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* 2000 1;289(5484):1550-4.
85. Brosius FC, Khoury CC, Buller CL, Chen S. Abnormalities in signaling pathways in diabetic nephropathy. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2010;5(1):51-64.
86. Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, Schneider H, Ruiz-Ortega M, Egido J. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(10):2505-12.
87. Yi B, Hu X, Zhang H, Huang J, Liu J, Hu J, Li W, Huang L. Nuclear NF-kappaB p65 in peripheral blood mononuclear cells correlates with urinary MCP-1, RANTES and the severity of type 2 diabetic nephropathy. *PLoS One* 2014;9(6):e99633.
88. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 2011 5;13(1):11-22.
89. Chew P, Yuen DY, Koh P, Stefanovic N, Febbraio MA, Kola I, Cooper ME, de Haan JB. Site-specific antiatherogenic effect of the antioxidant ebselen in the diabetic apolipoprotein E-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(6):823-30.
90. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799(10-12):775-87.
91. Ortiz-Munoz G, Martin-Ventura JL, Hernandez-Vargas P, Mallavia B, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Munoz-Garcia B, Fernandez-Vizarra P, Ortega L, Egido J, Gomez-Guerrero C. Suppressors of cytokine signaling modulate JAK/STAT-mediated cell responses during atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(4):525-31.
92. Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors* 2012;30(2):88-106.
93. Trengove MC, Ward AC. SOCS proteins in development and disease. *Am J Clin Exp Immunol* 2013;2(1):1-29.
94. Pellegrini S, Dusanter-Fourt I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem* 1997 15;248(3):615-33.
95. Miklosy G, Hilliard TS, Turkson J. Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(8):611-29.
96. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;16:293-322.

97. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2007;7(6):454-65.
98. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-64.
99. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2003;3(11):900-11.
100. Marrero MB, Banes-Berceli AK, Stern DM, Eaton DC. Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290(4):F762-F768.
101. Mueller A, Strange PG. CCL3, acting via the chemokine receptor CCR5, leads to independent activation of Janus kinase 2 (JAK2) and Gi proteins. *FEBS Lett* 2004 16;570(1-3):126-32.
102. Shi Y, Zhang Y, Wang C, Du C, Zhao S, Qi Z, Zhang Q, Duan H. Suppressor of cytokine signaling-1 reduces high glucose-induced TGF-beta1 and fibronectin synthesis in human mesangial cells. *FEBS Lett* 2008 15;582(23-24):3484-8.
103. Carow B, Rottenberg ME. SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Front Immunol* 2014;5:58.
104. Calegari VC, Bezerra RM, Torsoni MA, Torsoni AS, Franchini KG, Saad MJ, Velloso LA. Suppressor of cytokine signaling 3 is induced by angiotensin II in heart and isolated cardiomyocytes, and participates in desensitization. *Endocrinology* 2003;144(10):4586-96.
105. Gomez-Guerrero C, Lopez-Franco O, Sanjuan G, Hernandez-Vargas P, Suzuki Y, Ortiz-Munoz G, Blanco J, Egido J. Suppressors of cytokine signaling regulate Fc receptor signaling and cell activation during immune renal injury. *J Immunol* 2004 1;172(11):6969-77.
106. Michaylira CZ, Simmons JG, Ramocki NM, Scull BP, McNaughton KK, Fuller CR, Lund PK. Suppressor of cytokine signaling-2 limits intestinal growth and enterotrophic actions of IGF-I in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291(3):G472-G481.
107. Schlondorff D. The role of chemokines in the initiation and progression of renal disease. *Kidney Int Suppl* 1995;49:S44-S47.
108. Venkataraman C, Leung S, Salvekar A, Mano H, Schindler U. Repression of IL-4-induced gene expression by IFN-gamma requires Stat1 activation. *J Immunol* 1999 1;162(7):4053-61.
109. Berthier CC, Zhang H, Schin M, Henger A, Nelson RG, Yee B, Boucherot A, Neusser MA, Cohen CD, Carter-Su C, Argetsinger LS, Rastaldi MP, Brosius FC, Kretzler M. Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 2009;58(2):469-77.
110. Banes-Berceli AK, Shaw S, Ma G, Brands M, Eaton DC, Stern DM, Fulton D, Caldwell RW, Marrero MB. Effect of simvastatin on high glucose- and angiotensin II-induced activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291(1):F116-F121.
111. Shi YH, Zhao S, Wang C, Li Y, Duan HJ. Fluvastatin inhibits activation of JAK and STAT proteins in diabetic rat glomeruli and mesangial cells under high glucose conditions. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28(12):1938-46.

112. Lim WS, Timmins JM, Seimon TA, Sadler A, Kolodgie FD, Virmani R, Tabas I. Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo. *Circulation* 2008 19;117(7):940-51.
113. Agrawal S, Febbraio M, Podrez E, Cathcart MK, Stark GR, Chisolm GM. Signal transducer and activator of transcription 1 is required for optimal foam cell formation and atherosclerotic lesion development. *Circulation* 2007 12;115(23):2939-47.
114. Gharavi NM, Alva JA, Mouillesseaux KP, Lai C, Yeh M, Yeung W, Johnson J, Szeto WL, Hong L, Fishbein M, Wei L, Pfeffer LM, Berliner JA. Role of the Jak/STAT pathway in the regulation of interleukin-8 transcription by oxidized phospholipids in vitro and in atherosclerosis in vivo. *J Biol Chem* 2007 26;282(43):31460-8.
115. Gomez-Guerrero C, Mallavia B, Egido J. Targeting inflammation in cardiovascular diseases. still a neglected field? *Cardiovasc Ther* 2012;30(4):e189-e197.
116. Ortiz-Munoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Fernandez-Vizarra P, Mallavia B, Flores C, Sanz A, Blanco J, Mezzano S, Ortiz A, Egido J, Gomez-Guerrero C. Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(5):763-72.
117. Veenbergen S, Bennink MB, de Hooge AS, Arntz OJ, Smeets RL, van den Berg WB, van de Loo FA. Splenic suppressor of cytokine signaling 3 transgene expression affects T cell responses and prevents development of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58(12):3742-52.
118. Flodstrom-Tullberg M, Yadav D, Hagerkvist R, Tsai D, Secret P, Stotland A, Sarvetnick N. Target cell expression of suppressor of cytokine signaling-1 prevents diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 2003;52(11):2696-700.
119. Shi Y, Du C, Zhang Y, Ren Y, Hao J, Zhao S, Yao F, Duan H. Suppressor of cytokine signaling-1 ameliorates expression of MCP-1 in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2010;31(5):380-8.
120. Recio C, Oguiza A, Lazaro I, Mallavia B, Egido J, Gomez-Guerrero C. Suppressor of cytokine signaling 1-derived Peptide inhibits janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway and improves inflammation and atherosclerosis in diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(9):1953-60.
121. Grothausen C, Schuett H, Hillmer A, Lumpe S, Grote K, Ballmaier M, Bleich A, Glage S, Tietge UJ, Luchtefeld M, Schieffer B. Role of suppressor of cytokine signaling-1 in murine atherosclerosis. *PLoS One* 2012;7(12):e51608.
122. Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006 17;2006(357):re13.
123. Baima ET, Guzova JA, Mathialagan S, Nagiec EE, Hardy MM, Song LR, Bonar SL, Weinberg RA, Selness SR, Woodard SS, Chrencik J, Hood WF, Schindler JF, Kishore N, Mbalaviele G. Novel insights into the cellular mechanisms of the anti-inflammatory effects of NF-kappaB essential modulator binding domain peptides. *J Biol Chem* 2010 30;285(18):13498-506.
124. Lassila M, Seah KK, Allen TJ, Thallas V, Thomas MC, Candido R, Burns WC, Forbes JM, Calkin AC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Accelerated nephropathy in diabetic apolipoprotein e-

- knockout mouse: role of advanced glycation end products. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(8):2125-38.
125. Lopez-Parra V, Mallavia B, Lopez-Franco O, Ortiz-Munoz G, Oguiza A, Recio C, Blanco J, Nimmerjahn F, Egido J, Gomez-Guerrero C. Fcγ receptor deficiency attenuates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012;23(9):1518-27.
  126. Nilsson J, Bengtsson E, Fredrikson GN, Bjorkbacka H. Inflammation and immunity in diabetic vascular complications. *Curr Opin Lipidol* 2008;19(5):519-24.
  127. Williams MD, Nadler JL. Inflammatory mechanisms of diabetic complications. *Curr Diab Rep* 2007;7(3):242-8.
  128. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-κB1 and NF-κB2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004 1;382(Pt 2):393-409.
  129. Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y, Henger A, Brunner B, Eichinger F, Nitsche A, Kiss E, Bleich M, Grone HJ, Nelson PJ, Schlondorff D, Cohen CD, Kretzler M. Modular activation of nuclear factor-κB transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006;55(11):2993-3003.
  130. Hegazy DM, O'Reilly DA, Yang BM, Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. NFκB polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes. *Genes Immun* 2001;2(6):304-8.
  131. Romzova M, Hohenadel D, Kolostova K, Pinterova D, Fojtikova M, Ruzickova S, Dostal C, Bosak V, Rychlik I, Cerna M. NFκB and its inhibitor IκB in relation to type 2 diabetes and its microvascular and atherosclerotic complications. *Hum Immunol* 2006;67(9):706-13.
  132. Tilstra J, Rehman KK, Hennon T, Plevy SE, Clemens P, Robbins PD. Protein transduction: identification, characterization and optimization. *Biochem Soc Trans* 2007;35(Pt 4):811-5.
  133. Strickland I, Ghosh S. Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation. *Ann Rheum Dis* 2006;65 Suppl 3:iii75-iii82.
  134. Moles A, Sanchez AM, Banks PS, Murphy LB, Luli S, Borthwick L, Fisher A, O'Reilly S, van Laar JM, White SA, Perkins ND, Burt AD, Mann DA, Oakley F. Inhibition of RelA-Ser536 phosphorylation by a competing peptide reduces mouse liver fibrosis without blocking the innate immune response. *Hepatology* 2013;57(2):817-28.
  135. Chian CF, Chiang CH, Chuang CH, Liu SL. Inhibitor of nuclear factor-κB, SN50, attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Transl Res* 2014;163(3):211-20.
  136. Xue H, Chen B, Fan Y, Palikhe M, Li Y. The inhibitory effect of polypeptide cSN50 on alcoholic hepatic injuries through blocking the binding of NF-κB to importin α. *Scand J Gastroenterol* 2011;46(7-8):931-40.
  137. Letoha T, Somlai C, Takacs T, Szabolcs A, Jarmay K, Rakonczay Z, Jr., Hegyi P, Varga I, Kaszaki J, Krizbai I, Boros I, Duda E, Kusz E, Penke B. A nuclear import inhibitory peptide ameliorates the severity of cholecystokinin-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005 21;11(7):990-9.

138. Mallavia B, Recio C, Oguiza A, Ortiz-Munoz G, Lazaro I, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Schindler S, Depping R, Egido J, Gomez-Guerrero C. Peptide inhibitor of NF-kappaB translocation ameliorates experimental atherosclerosis. *Am J Pathol* 2013;182(5):1910-21.
139. Gamble C, McIntosh K, Scott R, Ho KH, Plevin R, Paul A. Inhibitory kappa B Kinases as targets for pharmacological regulation. *Br J Pharmacol* 2012;165(4):802-19.
140. Dasgupta S, Jana M, Zhou Y, Fung YK, Ghosh S, Pahan K. Antineuroinflammatory effect of NF-kappaB essential modifier-binding domain peptides in the adoptive transfer model of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 2004 15;173(2):1344-54.
141. Dave SH, Tilstra JS, Matsuoka K, Li F, Karrasch T, Uno JK, Sepulveda AR, Jobin C, Baldwin AS, Robbins PD, Plevy SE. Amelioration of chronic murine colitis by peptide-mediated transduction of the IkappaB kinase inhibitor NEMO binding domain peptide. *J Immunol* 2007 1;179(11):7852-9.
142. Jimi E, Aoki K, Saito H, D'Acquisto F, May MJ, Nakamura I, Sudo T, Kojima T, Okamoto F, Fukushima H, Okabe K, Ohya K, Ghosh S. Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nat Med* 2004;10(6):617-24.
143. Tas SW, de Jong EC, Hajji N, May MJ, Ghosh S, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Selective inhibition of NF-kappaB in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization. *Eur J Immunol* 2005;35(4):1164-74.
144. Ankermann T, Reisner A, Wiemann T, Krams M, Kohler H, Krause MF. Topical inhibition of nuclear factor-kappaB enhances reduction in lung edema by surfactant in a piglet model of airway lavage. *Crit Care Med* 2005;33(6):1384-91.
145. Reay DP, Yang M, Watchko JF, Daoood M, O'Day TL, Rehman KK, Guttridge DC, Robbins PD, Clemens PR. Systemic delivery of NEMO binding domain/IKKgamma inhibitory peptide to young mdx mice improves dystrophic skeletal muscle histopathology. *Neurobiol Dis* 2011;43(3):598-608.
146. Pamukcu B, Lip GY, Shantsila E. The nuclear factor--kappa B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. *Thromb Res* 2011;128(2):117-23.
147. Do GM, Kwon EY, Kim HJ, Jeon SM, Ha TY, Park T, Choi MS. Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 12;374(1):55-9.
148. Shin SK, Ha TY, McGregor RA, Choi MS. Long-term curcumin administration protects against atherosclerosis via hepatic regulation of lipoprotein cholesterol metabolism. *Mol Nutr Food Res* 2011;55(12):1829-40.
149. Cuaz-Perolin C, Billiet L, Bauge E, Copin C, Scott-Algara D, Genze F, Buchele B, Syrovets T, Simmet T, Rouis M. Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF-kappaB inhibitor acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in LPS-challenged ApoE-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(2):272-7.

150. Lopez-Franco O, Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, Sanjuan G, Suzuki Y, Ortega L, Blanco J, Egido J, Gomez-Guerrero C. Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(8):1864-70.
151. Mariappan N, Elks CM, Sriramula S, Guggilam A, Liu Z, Borkhsenius O, Francis J. NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. *Cardiovasc Res* 2010 1;85(3):473-83.
152. Chiba T, Kondo Y, Shinozaki S, Kaneko E, Ishigami A, Maruyama N, Umezawa K, Shimokado K. A selective NFkappaB inhibitor, DHMEQ, reduced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *J Atheroscler Thromb* 2006;13(6):308-13.
153. Kassan M, Choi SK, Galan M, Bishop A, Umezawa K, Trebak M, Belmadani S, Matrougui K. Enhanced NF-kappaB activity impairs vascular function through PARP-1-, SP-1-, and COX-2-dependent mechanisms in type 2 diabetes. *Diabetes* 2013;62(6):2078-87.
154. Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* 2007;39(2):86-93.
155. Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, Skjelland M, Gullestad L, Oie E, Aukrust P. Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque? *Prog Cardiovasc Dis* 2008;51(3):183-94.
156. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* 2011;21(2):223-44.
157. Oh H, Ghosh S. NF-kappaB: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev* 2013;252(1):41-51.
158. Wu CC, Chen JS, Lu KC, Chen CC, Lin SH, Chu P, Sytwu HK, Lin YF. Aberrant cytokines/chemokines production correlate with proteinuria in patients with overt diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* 2010 2;411(9-10):700-4.
159. Mahmoud F, Al-Ozairi E. Inflammatory cytokines and the risk of cardiovascular complications in type 2 diabetes. *Dis Markers* 2013;35(4):235-41.
160. Al-Saikhani FI. The gene therapy revolution in ophthalmology. *Saudi J Ophthalmol* 2013;27(2):107-11.
161. Maier P, von KC, Laufs S. Retroviral vectors for gene therapy. *Future Microbiol* 2010;5(10):1507-23.
162. Nienhuis AW. Development of gene therapy for blood disorders: an update. *Blood* 2013 29;122(9):1556-64.
163. Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(5):980-5.
164. White GE, Cotterill A, Addley MR, Soilleux EJ, Greaves DR. Suppressor of cytokine signalling protein SOCS3 expression is increased at sites of acute and chronic inflammation. *J Mol Histol* 2011;42(2):137-51.



165. Rastmanesh MM, Bluysen HA, Joles JA, Boer P, Willekes N, Braam B. Increased expression of SOCS3 in monocytes and SOCS1 in lymphocytes correlates with progressive loss of renal function and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. *Eur J Pharmacol* 2008 28;593(1-3):99-104.
166. Liang X, He M, Chen T, Liu Y, Tian YL, Wu YL, Zhao Y, Shen Y, Yuan ZY. Multiple roles of SOCS proteins: differential expression of SOCS1 and SOCS3 in atherosclerosis. *Int J Mol Med* 2013;31(5):1066-74.
167. Palmer DC, Restifo NP. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol* 2009;30(12):592-602.
168. Sakurai H, Tashiro K, Kawabata K, Yamaguchi T, Sakurai F, Nakagawa S, Mizuguchi H. Adenoviral expression of suppressor of cytokine signaling-1 reduces adenovirus vector-induced innate immune responses. *J Immunol* 2008 1;180(7):4931-8.
169. Qin L, Huang Q, Zhang H, Liu R, Tellides G, Min W, Yu L. SOCS1 prevents graft arteriosclerosis by preserving endothelial cell function. *J Am Coll Cardiol* 2014 7;63(1):21-9.
170. Tajiri K, Imanaka-Yoshida K, Matsubara A, Tsujimura Y, Hiroe M, Naka T, Shimojo N, Sakai S, Aonuma K, Yasutomi Y. Suppressor of cytokine signaling 1 DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. *J Immunol* 2012 15;189(4):2043-53.
171. Fang M, Dai H, Yu G, Gong F. Gene delivery of SOCS3 protects mice from lethal endotoxic shock. *Cell Mol Immunol* 2005;2(5):373-7.
172. Sikorski K, Czerwonec A, Bujnicki JM, Wesoly J, Bluysen HA. STAT1 as a novel therapeutical target in pro-atherogenic signal integration of IFNgamma, TLR4 and IL-6 in vascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22(4):211-9.
173. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Ther* 2008;120(2):172-85.
174. Taleb S, Romain M, Ramkhelawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, Esposito B, Perez N, Yasukawa H, Van SJ, Yoshimura A, Tedgui A, Mallat Z. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med* 2009 28;206(10):2067-77.
175. Qin H, Holdbrooks AT, Liu Y, Reynolds SL, Yanagisawa LL, Benveniste EN. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *J Immunol* 2012 1;189(7):3439-48.
176. Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhrel MA, Vanhoutte J, Copin C, Sebti Y, Derudas B, Mayi T, Bories G, Talleux A, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Staels B. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRA pathways. *Circ Res* 2011 15;108(8):985-95.
177. Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE, Febbraio M. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res* 2008 1;78(1):185-96.

178. Piechota M, Banaszewska A, Dudziak J, Slomczynski M, Plewa R. Highly upregulated expression of CD36 and MSR1 in circulating monocytes of patients with acute coronary syndromes. *Protein J* 2012;31(6):511-8.
179. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2013 23;424:245-52.
180. Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin Transl Med* 2015;4:5.
181. Xie JJ, Wang J, Tang TT, Chen J, Gao XL, Yuan J, Zhou ZH, Liao MY, Yao R, Yu X, Wang D, Cheng Y, Liao YH, Cheng X. The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(-/-) mice. *Cytokine* 2010;49(2):185-93.
182. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011;17(11):1410-22.



## **VIII.ANEXOS**

